



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo y validación de métodos
bioanalíticos para cuantificar metformina
y famotidina: dos fármacos modelo de
permeabilidad *in vitro***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARITZA VILLANUEVA PÉREZ



Ciudad Universitaria, CD. MX.,

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

PRESIDENTE:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL:	Dra. Inés Fuentes Noriega
SECRETARIO:	Dra. Blanca Estela Rivero Cruz
1er. Suplente:	M. en C. Silvia Reyes Salinas
2do. Suplente:	M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 113. Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Supervisor técnico

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

Sustentante

Maritza Villanueva Pérez

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE GRÁFICAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Desarrollo de nuevos fármacos	4
3.1.1 Fases en el desarrollo de nuevos medicamentos	5
3.2 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)	8
3.3 Validación de métodos bioanalíticos	13
3.3.1 Desarrollo del método bioanalítico	14
3.3.2 Parámetros de validación	15
3.3.2.1 Selectividad	17
3.3.2.2 Linealidad	17
3.3.2.3 Límite de cuantificación	18
3.3.2.4 Exactitud	18
3.3.2.5 Precisión	19
3.3.2.6 Recobro	19
3.3.2.7 Estabilidad	20
3.4 Marcadores de alta y baja permeabilidad	22
3.4.1 Metformina	22
3.4.2 Famotidina	25
4. METODOLOGÍA	28
4.1 Métodos bioanalíticos para cuantificar metformina y famotidina	28
4.1.1 Desarrollo del método	28

4.1.2	Diseño de experimentos para el desarrollo de los métodos cromatográficos.....	29
4.1.3	Preparación de soluciones.....	30
4.1.3.1	Soluciones stock.....	30
4.1.3.2	Solución de Hank (HBSS)	30
4.1.4	Evaluación del sistema.....	30
4.1.4.1	Adecuabilidad	30
4.1.3.2	Precisión.....	30
4.1.3.3	Linealidad	31
4.1.5	Validación de los métodos bioanalíticos.....	32
4.1.5.1	Linealidad	33
4.1.5.2	Exactitud, precisión y recobro.....	33
4.1.5.3	Límite de cuantificación	34
4.1.5.4	Estabilidad	34
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1	Métodos bioanalíticos para cuantificar metformina y famotidina	36
5.1.1	Desarrollo de los métodos bioanalíticos.....	36
5.1.1.1	Diseño de experimentos factorial para la metformina	38
5.1.1.2	Diseño de experimentos factorial para la famotidina	46
5.1.2	Evaluación del sistema.....	51
5.1.2.1	Adecuabilidad	51
5.1.2.2	Precisión del sistema.....	54
5.1.2.3	Linealidad del sistema	55
5.1.3	Validación de los métodos bioanalíticos.....	69
5.1.3.1	Linealidad del método	70
5.1.3.2	Precisión y exactitud.....	75
5.1.3.3	Recobro.....	78
5.1.3.4	Límite de cuantificación	79
5.1.3.5	Estabilidad de la muestra	82

6. CONCLUSIONES	85
7. PERSPECTIVAS	86
8. BIBLIOGRAFÍA	87

LISTA DE FIGURAS

Número	Nombre	Página
Figura 3.1	Fases secuenciales en los estudios clínicos de nuevos fármacos	5
Figura 3.2	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica	8
Figura 3.3	Estructura química de la metformina	22
Figura 3.4	Estructura química de la famotidina	25
Figura 5.1	Espectro de absorción en el UV para la metformina	36
Figura 5.2	Espectro de absorción en el UV para la famotidina	37
Figura 5.3	Diagrama de Pareto de los factores evaluados	41
Figura 5.4	Gráficas de superficie de respuesta estimada para la metformina (fijando la proporción de agua al 60%)	43
Figura 5.5	Gráficas de superficie de respuesta estimada para la metformina	44
Figura 5.6	Cromatograma obtenido para la metformina a una concentración de 140 μM	45
Figura 5.7	Cromatograma obtenido para la famotidina a una concentración de 90 μM	50
Figura 5.8	Cromatograma obtenido para el límite de cuantificación de la metformina	81
Figura 5.9	Cromatograma obtenido para el límite de cuantificación de la famotidina	81

LISTA DE GRÁFICAS

Número	Nombre	Página
Gráfica 5.1	Gráfica de efectos principales	40
Gráfica 5.2	Gráfica de interacciones entre los factores del diseño experimental	41
Gráfica 5.3	Linealidad del sistema	58
Gráfica 5.4	Gráfica de la probabilidad normal para la linealidad del sistema	60
Gráfica 5.5	Gráfica de los residuos en función de las observaciones	61
Gráfica 5.6	Gráfica de los residuos en función de los valores ajustados	62
Gráfica 5.7	Gráfica de los residuos en función del regresor	62
Gráfica 5.8	Linealidad del sistema para cuantificar famotidina	66
Gráfica 5.9	Gráfica de la probabilidad normal para la linealidad del sistema	66
Gráfica 5.10	Linealidad del método para cuantificar metformina	70
Gráfica 5.11	Linealidad del método para cuantificar famotidina	73

LISTA DE TABLAS

Número	Nombre	Página
Tabla 3.1	Principales características de las fases del desarrollo de medicamentos	6
Tabla 3.2	Fármacos modelos cuyo uso esta sugerido para establecer la aptitud de un método de permeabilidad	11
Tabla 3.3	Fármacos modelos cuyo uso esta sugerido para establecer la aptitud de un método de permeabilidad	12
Tabla 4.1	Factores evaluados en el diseño experimental para la metformina	29
Tabla 4.2	Factores evaluados en el diseño experimental para la famotidina	29
Tabla 4.3	Diluciones realizadas para preparar los puntos control (QCs) para la metformina	31
Tabla 4.4	Diluciones realizadas para preparar los puntos control (QCs) para la famotidina	31
Tabla 4.5	Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración para la metformina	32
Tabla 4.6	Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración para la famotidina	32
Tabla 5.1	Aleatorización del diseño factorial y resultados obtenidos para evaluar el factor coleo del pico	38
Tabla 5.2	Análisis de varianza para el modelo	40
Tabla 5.3	Condiciones cromatográficas para cuantificar metformina	45
Tabla 5.4	Aleatorización del diseño factorial y resultados obtenidos para evaluar el factor coleo del pico	46
Tabla 5.5	Modelo factorial estimado y análisis de varianza para el modelo	47
Tabla 5.6	Diagrama de Pareto de los factores evaluados, gráfica de los efectos principales para la respuesta, interacciones entre los factores del diseño experimental	48

CONTINUACIÓN. LISTA DE TABLAS

Número	Nombre	Página
Tabla 5.7	Grafica de superficie estimada y grafica de contornos de la superficie de respuesta estimada	49
Tabla 5.8	Condiciones cromatográficas para validar el método	50
Tabla 5.9	Adecuabilidad del sistema para analizar metformina	53
Tabla 5.10	Adecuabilidad del sistema para analizar famotidina	53
Tabla 5.11	Precisión del sistema para cuantificar metformina	54
Tabla 5.12	Precisión del sistema para la cuantificación de famotidina	55
Tabla 5.13	Análisis de la regresión del modelo de linealidad del sistema de la metformina	57
Tabal 5.14	Valores ajustados y residuales para las observaciones de la linealidad del sistema	59
Tabal 5.15	Análisis de varianza de la regresión lineal con carencia de ajuste	63
Tabla 5.16	Datos estadísticos de la regresión lineal del sistema	64
Tabla 5.17	Análisis de la regresión del modelo de linealidad del sistema	64
Tabla 5.18	Valores ajustados y residuales para las observaciones de la linealidad del sistema	65
Tabla 5.19	Gráfica de los residuos en función de las observaciones, gráfica de los residuos en función de los valores ajustados, gráfica de los residuos en función del regresor	68
Tabla 5.20	Análisis de varianza de la regresión lineal con carencia de ajuste	69
Tabla 5.21	Datos estadísticos de la regresión lineal del sistema	69
Tabla 5.22	Análisis de la regresión para establecer el modelo de linealidad del método	71
Tabla 5.23	Análisis de varianza de la regresión lineal con carencia de ajuste	72

CONTINUACIÓN. LISTA DE TABLAS

Número	Nombre	Página
Tabla 5.24	Datos estadísticos de la regresión lineal del método	72
Tabla 5.25	Análisis de la regresión lineal para establecer el modelo de linealidad del método	74
Tabla 5.26	Análisis de varianza de la regresión lineal con carencia de ajuste	74
Tabla 5.27	Datos estadísticos de la regresión lineal del método	74
Tabla 5.28	Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y exactitud del método para cuantificar metformina	76
Tabla 5.29	Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y exactitud del método para cuantificar famotidina	76
Tabla 5.30	Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar metformina	77
Tabla 5.31	Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar famotidina	77
Tabla 5.32	Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método para cuantificar metformina	78
Tabla 5.33	Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método para cuantificar famotidina	78
Tabla 5.34	Resultados obtenidos para evaluar la precisión y la exactitud del límite inferior de cuantificación de la metformina	80
Tabla 5.35	Resultados obtenidos para evaluar la precisión y la exactitud del límite inferior de cuantificación de la famotidina	80
Tabla 5.36	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la metformina	83
Tabla 5.37	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la famotidina	84

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
IVIVC	Correlaciones <i>in vivo-in vitro</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
IND	Nuevo Fármaco en Investigación
NDA	Solicitud de un Nuevo Medicamento
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CAS	Comisión de Autorización Sanitaria
mL	Mililitro
IS	Estándar Interno
ES	Sustratos de efflux
AAPS	Asociación Americana de Científicos Farmacéuticos
FIP	Federación Farmacéutica Internacional
HPB	Oficina de Protección de la Salud
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos
UV	Ultravioleta
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
LLOQ	Límite inferior de cuantificación
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
CV	Coefficiente de Variación
QC	Puntos Control
h	Horas
g	Gramo
mg	Miligramo
°C	Grados Celsius
Log P	Coefficiente de Reparto
Da	Dalton
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
SOP	Síndrome de Ovario Poliquístico
EHNA	Esteatohepatitis no Alcohólicas
L	Litros
kg	Kilogramos

CONTINUACIÓN. LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
GLUT4	Proteína transportadora de glucosa
µm	Micrómetros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrilo
µL	Microlitros
H₂O	Agua
min	Minutos
µM	Micromolar
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
M	Molar
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
TEA	Trietilamina
k'	Factor de capacidad
R	Resolución
T	Factor de coleo
N	Número de platos teóricos
β₁	Pendiente
β₀	Ordenada al origen
H₀	Hipótesis nula
H₁	Hipótesis alternativa
n	Número de observaciones
α	Nivel de significancia
NOM	Norma Oficial Mexicana
DE	Desviación estándar
\bar{X}	Promedio
FM	Fase Móvil
HBSS	Solución de Hank
VN	Valor Nominal
fa	Fracción absorbida



1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, se estima que el 80% de la población mundial utiliza medicinas derivadas (directa o indirectamente) de plantas medicinales para la atención primaria de la salud. Medicina herbolaria, fitoterapia, fitomedicina, nutracéuticos, productos naturales medicinales, medicina complementaria y alternativa, etnomedicina, botánicos, suplementos dietéticos y fitofarmacéuticos son términos que se emplean, de manera indistinta, para denotar el uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud.

En los países desarrollados existe un gran interés por los organismos regulatorios para incluir formulaciones de medicina tradicional en sus programas de salud. La seguridad, la eficacia y la calidad de estos insumos dependen de factores como la formulación y su proceso de manufactura. De manera general, los factores de la formulación que afectan la biodisponibilidad de los fármacos se clasifican en dos categorías: factores que afectan la disolución o liberación de los fármacos a partir de su forma farmacéutica y; factores relacionados con los excipientes que afectan la estabilidad del fármaco, su absorción y/o sus procesos metabólicos. Si bien, para los medicamentos alopáticos se encuentran bien establecidos los factores en la formulación que afectan la biodisponibilidad, para los productos vegetales; esta información no se conoce aún. Por lo tanto, para establecer cómo las diferentes formulaciones afectan la biodisponibilidad de los fármacos de origen natural se necesita conocer la relación que guardan sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas con sus propiedades farmacocinéticas y el desempeño *in vitro* del producto farmacéutico [1].

En este marco de referencia, el sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB), es una base científica que permite clasificar a los medicamentos en función de su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal [2]. Para clasificar a los fármacos de acuerdo con su permeabilidad, la FDA, aprueba el empleo de estudios farmacocinéticos de balance de masa, de biodisponibilidad absoluta y métodos de permeabilidad intestinal (perfusión intestinal, *in vivo*, en humanos; perfusión



intestinal, en animales, *in vivo* o *in situ*; en tejidos intestinales aislados de humano o animales y en monocapas celulares epiteliales *in vitro*). Debido a que los estudios de biodisponibilidad absoluta o de perfusión intestinal en humanos son costosos y difíciles de realizar, la guía emitida por la FDA proporciona, además, una alternativa para extrapolar la velocidad de absorción del fármaco utilizando correlaciones *in vivo-in vitro* (IVIVC) [3].

Agencias regulatorias como la FDA, la OMS y la EMA han adoptado el SCB como estándar para establecer la biodisponibilidad/bioequivalencia de formas farmacéuticas sólidas sujetas a un proceso de aprobación. A pesar de que el SCB se ha utilizado con éxito en el ámbito de la medicina alópata su validez y aplicación, en la medicina herbolaria, ha recibido poca atención. Entre las numerosas técnicas descritas para evaluar la permeabilidad intestinal, la línea celular Caco-2, representa el modelo de barrera intestinal más empleado y mejor caracterizado para predecir la absorción de fármacos [4].

Para demostrar la adecuabilidad de un método enfocado a determinar el SCB de fármacos se requiere establecer una relación orden-categoría entre los valores de permeabilidad y el grado de absorción del fármaco en humanos. Para establecer esta relación, la FDA recomienda utilizar veinte fármacos modelo para métodos *in vitro* con células epiteliales. Una vez demostrada la aptitud del método se puede emplear para clasificar fármacos utilizando como patrones internos un fármaco modelo de alta, baja o moderada permeabilidad.

Con base en estas consideraciones, el presente trabajo fue diseñado para desarrollar y validar dos métodos bioanalíticos conducentes a cuantificar dos marcadores de permeabilidad. Los parámetros de calidad a evaluar para asegurar la confiabilidad del desempeño de un método bioanalítico son: linealidad, exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad.



2. OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Desarrollar y validar dos métodos bioanalíticos apropiados que permitan cuantificar metformina y famotidina: dos fármacos modelo para el estudio de permeabilidad *in vitro*.

Objetivos particulares

- Desarrollar una metodología bioanalítica que permita la determinación de la metformina y la famotidina en una matriz biológica utilizando como técnica analítica la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Validar los métodos bioanalíticos con base a los parámetros establecidos en la guía de validación de métodos bioanalíticos “*Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*” emitida por la FDA en septiembre del 2013.



3. ANTECEDENTES

3.1 Desarrollo de nuevos fármacos

Durante cientos de años el poder terapéutico de las plantas ha sido la base de la farmacología [5]. En nuestro país, a principios del siglo XIX, los fármacos disponibles para la terapéutica, se encontraban en preparaciones crudas de plantas, animales o minerales. Posteriormente, debido al desarrollo de la experimentación fisiológica, y de la química medicinal en países Europeos, el aislamiento, la purificación y la identificación de componentes activos de viejas preparaciones, así como la síntesis de nuevos fármacos se hizo posible. El avance de la farmacología, favorecido por el desarrollo de métodos de experimentación, no solo permitió distinguir los principios activos de preparaciones que contenían mezclas complejas de sustancias, también, permitió determinar cómo estos producen sus efectos en los organismos vivos. De forma simultánea, la intensa investigación desarrollada dentro de la industria farmacéutica, originó la proliferación de medicamentos nuevos. Un número mayor de pacientes se beneficiaron con la introducción de estos productos. Sin embargo, muchos carecían de investigación clínica sistematizada, y la aparición de efectos adversos severos, como la focomelia producida por la talidomida en 1962, obligó a los gobiernos a emitir normas y reglamentos que protegieran al ser humano de los efectos tóxicos propios de todo fármaco [6].

Actualmente, el desarrollo de un nuevo medicamento es una empresa de elevado riesgo que requiere un notable esfuerzo humano así como recursos técnicos y económicos. Es un proceso complejo en el que la investigación y la simultánea toma de decisiones, van encaminadas a la identificación y validación de una molécula diana, entre un importante número de compuestos, por sus características farmacológicas y su menor toxicidad y/o efectos adversos [7].



3.1.1 Fases en el desarrollo de nuevos medicamentos

El proceso de investigación y desarrollo de un medicamento tiene esencialmente 4 etapas clásicas: la búsqueda del principio activo, la etapa preclínica, la etapa clínica, y el registro, lanzamiento y comercialización del medicamento (**Figura 3.1**) [8].

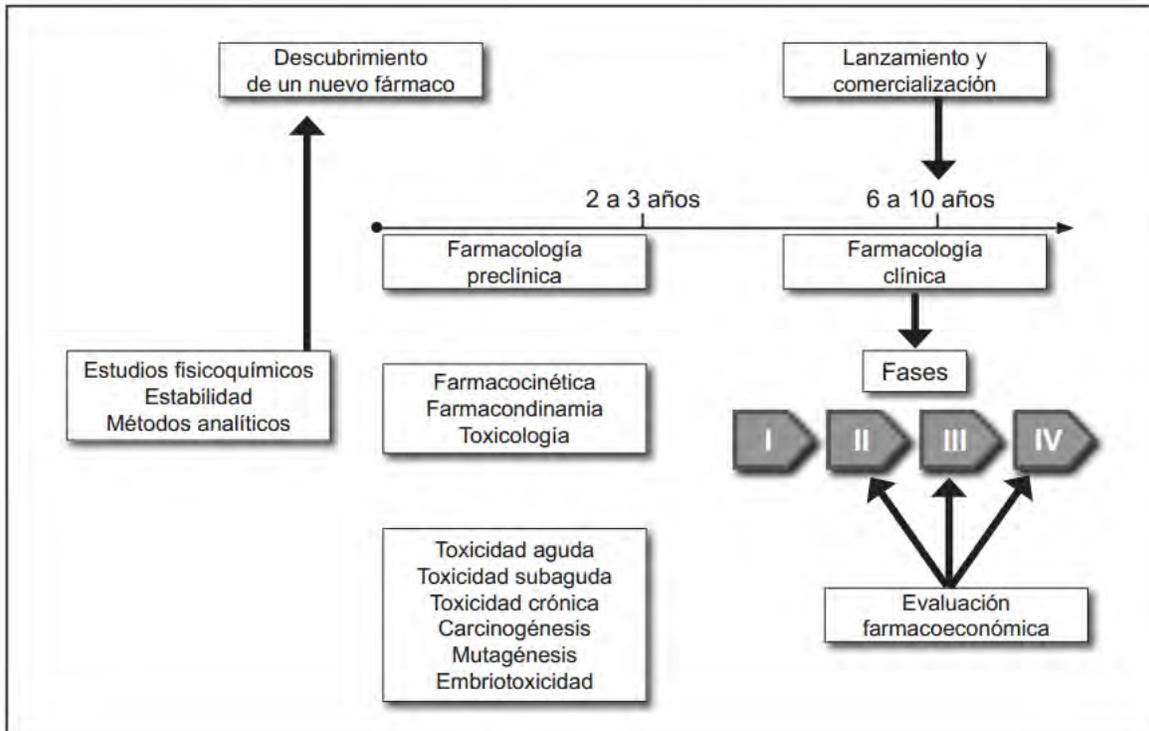


Figura 3.1 Fases secuenciales en los estudios clínicos de nuevos fármacos [8]

Si bien, las agencias regulatorias de cada país establecen los procedimientos para la aprobación de ensayos clínicos y el registro de medicamentos, es usual referirse a la normatividad de la Food and Drug Administration (FDA) para ilustrar el proceso de aprobación de una nueva droga, debido al elevado nivel de vigilancia y el alto grado de especialización requerido (**Tabla 3.1**) [9].

Tabla 3.1 Principales características de las fases del desarrollo de medicamentos [5-7].

Etapas en el desarrollo de un medicamento	Características principales	
Descubrimiento de fármacos	Constituida esencialmente por la investigación de los blancos terapéuticos y el desarrollo de nuevas moléculas que interactúan con estos blancos. En general, la optimización de la molécula. Tiene una duración de 2-5 años	
Desarrollo Preclínico	Los estudios preclínicos se realizan en animales y modelos fisiológicos en el laboratorio, se analizan las propiedades físico-químicas y el comportamiento del compuesto <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Se evalúan un gran rango de parámetros de la molécula incluyendo estabilidad, niveles plasmáticos y tisulares, propiedades farmacocinéticas, toxicidad aguda y crónica. Basado en los resultados de esta etapa, se evalúa el desarrollo de formulaciones para estudios clínicos y se proponen evaluaciones farmacológicas más extensas. Estos estudios duran en promedio de 3-5 años.	Candidato a Fármaco
Desarrollo clínico	Fase I Es el primer estadio de desarrollo de medicamentos en seres humanos con el fin de evaluar su perfil de seguridad y tolerancia con ensayos de dosis-respuesta en una pequeña muestra de voluntarios sanos (20-80); se evalúa además su farmacocinética, sus vías de administración, así como interacciones con alimentos u otros fármacos. La solicitud para acceder a ensayos de fase I debe incluir datos químicos y de manufactura, resultados de pruebas en animales; el propósito de estos estudios es obtener una solicitud conocida como IND (nuevo fármaco en investigación, por sus siglas en inglés). Tienen una duración de 1-2 años.	Desarrollo Compuesto
	Fase II Cuando en la Fase I son obtenidos resultados confiables el fármaco es estudiado por primera vez, en pacientes con la enfermedad determinada a tratar (20-80); se evalúa la seguridad, la eficacia, la farmacocinética y la tolerancia. En esta fase se establecen las relaciones dosis-respuesta terapéutica, además, se diseña con frecuencia un estudio ciego en donde los pacientes desconocen el tratamiento, así como, el control positivo (grupo que recibe el fármaco nuevo).	
	Fase III En este punto se completa la información de efectividad y seguridad al administrar el fármaco a un número elevado de pacientes (multicéntricos). Se determina el perfil terapéutico del medicamento, la dosis, la forma farmacéutica, los eventos adversos, las contraindicaciones y precauciones con el objetivo de obtener la aprobación del producto.	
Aprobación regulatoria	Si los resultados de las fases I, II, y III son favorables se procede con una nueva solicitud denominada NDA (solicitud de un nuevo medicamento, por sus siglas en inglés) que contiene la información preclínica y clínica, el perfil químico, el proceso de manufactura, la farmacología y toxicidad, la farmacocinética en humanos y las indicaciones propuestas.	Propuesta regulatoria
Fase IV	Tiene como objetivo conocer la efectividad del fármaco a largo plazo y la relación costo-beneficio en relación a otros productos farmacéuticos; además, exploran nuevas indicaciones terapéuticas, formulaciones e interacciones. Apoyan la definición de eficacia terapéutica real, el seguimiento de eventos adversos a largo plazo y el impacto en la calidad de vida. Esta etapa es mejor conocida como Farmacovigilancia.	Fármaco aprobado para comercialización



En México, gran parte de la investigación en torno al descubrimiento de nuevas moléculas se realiza en instituciones académicas **[10]**.

De acuerdo con el documento titulado “Hacia una política Farmacéutica Integral para México”, publicado en el 2005, por la Secretaria de Salud los medicamentos que se usen en México deben ser seguros, eficaces y de calidad **[11]**.

La Secretaria de Salud, como autoridad sanitaria, a través de un órgano desconcentrado denominado Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) ejercerá las atribuciones de regulación, control y fomento sanitarios. Este organismo cuenta con una unidad administrativa denominada Comisión de Autorización Sanitaria (CAS) que se encarga de: expedir, prorrogar o revocar la autorización de proyectos relacionados con el empleo de insumos para la salud y los procedimientos o actividades experimentales, en seres humanos, con fines de investigación científica **[12]**.

Generalmente, durante las fases del desarrollo de medicamentos, los fármacos en estudio son cuantificados en sangre o plasma ya que, es un tejido de fácil acceso. Se espera que las concentraciones del fármaco en dicho tejido guarden una cierta proporcionalidad con el efecto terapéutico y se pueda ajustar la dosis para mantener el efecto farmacodinámico deseado **[10]**. Para este propósito debe considerarse que la absorción sistémica de la mayoría de los productos farmacéuticos se compone de una sucesión de procesos: (i) la desintegración del producto; (ii) la disolución del fármaco en un entorno acuoso; y (iii) la absorción a través de las membranas celulares en la circulación sistémica y, en última instancia, a su sitio de acción **[13]**.



3.2 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)

El SCB fue publicado por Gordon Amidon y colaboradores en 1995. Se basa en un sólido fundamento científico para clasificar un fármaco considerando los parámetros de solubilidad y permeabilidad: factores estrechamente relacionados con el proceso de absorción. El SCB plantea como objetivo, la posibilidad de establecer correlaciones *in vitro-in vivo* que permitan sustituir los ensayos realizados en humanos por ensayos de disolución *in vitro*, con base en la clasificación obtenida para el fármaco [14,15].

El SCB considera tres factores principales que gobiernan la velocidad y el alcance de la absorción del fármaco a partir de formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal [16]. De acuerdo en estos factores divide a los fármacos en cuatro grupos o clases (Figura 3.2).

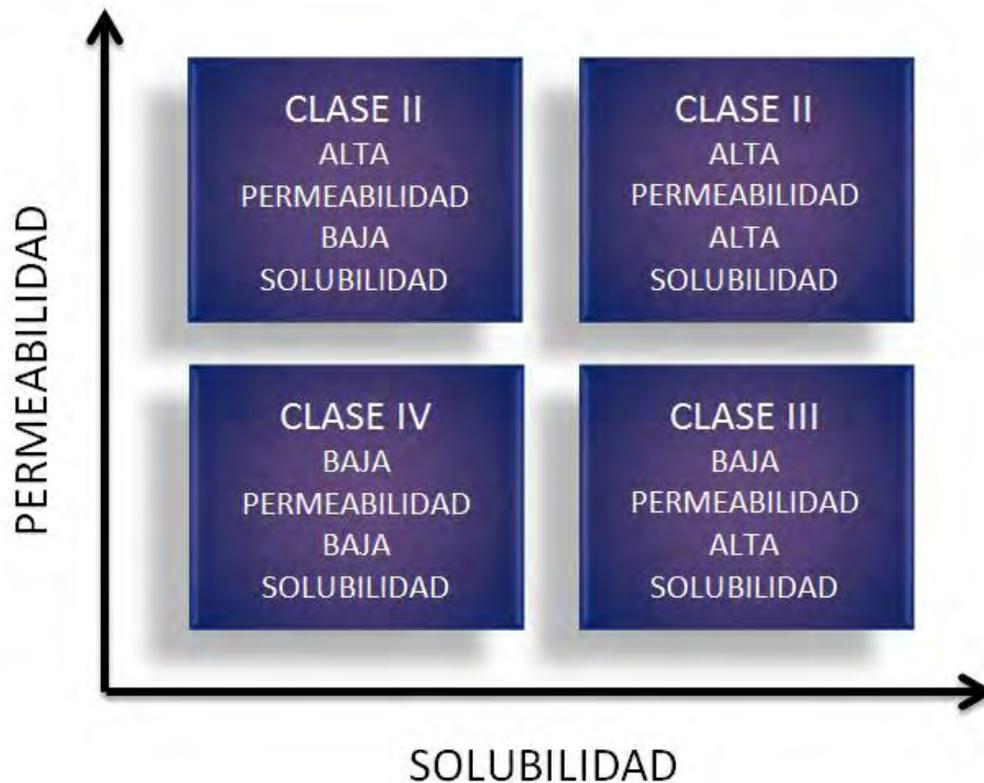


Figura 3.2 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica [17]



Para clasificar los fármacos se deben conocer los límites de referencia establecidos en las guías de la FDA y el anexo 7, del informe 40, de la OMS tanto para la solubilidad como para la permeabilidad **[18-19]**:

- Solubilidad: se considera que un fármaco es de alta solubilidad cuando su mayor dosis (recomendada por la OMS o disponible en el mercado como forma sólida oral) es soluble en 250 mL o menos, de medio acuoso, en un rango de pH de 1.2-7.5 y 1.2-6.8 de acuerdo con la FDA y la OMS, respectivamente.
- Permeabilidad: se clasifica como altamente permeable, si la cantidad absorbida en humanos es mayor al 85%, según la OMS, y 90%, según la FDA.
- Se considera que un fármaco es de rápida disolución cuando no menos del 85% de la cantidad indicada en el marbete se disuelve dentro de los primeros 30 minutos.

La habilidad de un compuesto administrado oralmente para absorberse a través de la mucosa intestinal puede estar limitada por los componentes físicos y/o bioquímicos de la barrera epitelial, por lo que los modelos de permeabilidad no solo deben predecir el potencial de absorción intestinal de un fármaco, sino también proporcionar información para comprender los mecanismos de absorción involucrados **[20]**.

En este contexto, se han desarrollado diversos modelos para evaluar la permeabilidad de fármacos. De manera general, se clasifican en métodos fisicoquímicos, *in silico*, *in vitro*, *in vivo* e *in situ*. Los métodos recomendados por la FDA para evaluar la permeabilidad de una molécula son las metodologías por perfusión intestinal *in situ*, con modelos animales adecuados, o bien, métodos *in vitro* empleando tejidos intestinales o monocapas de células epiteliales adecuadas. Cada modelo tiene sus ventajas y desventajas ya que se pueden controlar distintas condiciones fisiológicas. La selección depende de la etapa de desarrollo del fármaco y de las preguntas que necesiten responderse en el



momento. Ninguno puede proporcionar datos suficientes como un modelo independiente, por lo que, el uso de uno o más modelos pueden ser útiles para reducir el tiempo y el consumo de recursos durante el proceso y descubrimiento de fármacos **[16]**.

Asimismo, la FDA establece un listado con 20 compuestos que pueden ser utilizados para determinar la adecuabilidad del modelo de permeabilidad elegido. Entre éstos, se encuentran la metformina y la famotidina, dos fármacos que han sido clasificados como marcadores de moderada y baja permeabilidad, respectivamente, **(Tablas 3.2 y 3.3)**.



Tabla 3.2 Fármacos modelos cuyo uso esta sugerido para establecer la aptitud de un método de permeabilidad según lo descrito en la guía emitida por la FDA [21].

Fármaco	Clase de permeabilidad
Antipirina	Alta (Posible candidato de IS)
Cafeína	Alta
Carbamazepina	Alta
Fluvastatín	Alta
Ketoprofeno	Alta
Metopropol	Alta (Posible candidato de IS)
Naproxeno	Alta
Propanolol	Alta
Teofilina	Alta
Varapamilo	Alta (Posible candidato de ES)
Amoxicilina	Baja
Atenolol	Baja
Furosemida	Baja
Hidroclorotiazida	Baja
Manitol	Baja (Posible candidato de IS)
α-Metildopa	Baja
Polietilenglicol (400)	Baja
Polietilenglicol(1000)	Baja
Polietilenglicol (4000)	Baja (Marcador de permeabilidad cero)
Ranitidina	Baja



Tabla 3.3 Fármacos modelos cuyo uso esta sugerido para establecer la aptitud de un método de permeabilidad según lo descrito en la revisión de la guía emitida por la FDA [22].

Grupo	Fármaco
Alta Permeabilidad ($f_a \geq 85\%$)	Antipirina
	Cafeína
	Ketoprofeno
	Naproxeno
	Teofilina
	Metopropol
	Carbamazepina
	Fenitonía
	Disopiramida
	Minoxidil
Moderada permeabilidad ($f_a = 50-84\%$)	Clorfeniramina
	Creatinina
	Terbutalina
	Hidroclorotiazida
	Enalapril
	Furosemida
	Metformina
	Amilorida
Atenolol	
Ranitidina	
Baja permeabilidad ($f_a < 50\%$)	Famotidina
	Nadolol
	Sulpirida
	Lisinopril
	Aciclovir
	Foscarnet
	Manitol
	Clorotiazida
	Polietilenglicol 400
	Enalapril
Cero permeabilidad	FITC-Dextran
	Polietilenglicol 4000
	Lucifer amarillo
	Inulina
	Lactosa



Tabla 3.3 Continuación. Fármacos modelos cuyo uso esta sugerido para establecer la aptitud de un método de permeabilidad según lo descrito en la revisión de la guía emitida por la FDA [22].

Grupo	Fármaco
Sustratos de efflux	Digoxina
	Paclitaxel
	Quinidina
	Vinblastina

Una vez demostrada la aptitud de un método se puede emplear para clasificar fármacos utilizando, como patrones internos, un fármaco modelo de alta y baja permeabilidad [21]. Sin embargo, los métodos de análisis empleados para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en muestras biológicas deben generar datos reproducibles y confiables con el fin de permitir una interpretación válida de los estudios que sustenta.

3.3 Validación de métodos bioanalíticos

Se denomina método bioanalítico al conjunto de procedimientos que involucran la recolección, el almacenamiento, el procesamiento y el análisis de un analito que se encuentra en un fluido biológico (como lo es la sangre, la orina, la saliva, etc.) [23].

En el desarrollo de nuevos fármacos juega un papel importante en la evaluación e interpretación de los datos de biodisponibilidad, bioequivalencia, farmacocinética y toxicocinética. En general, la calidad de estos estudios está directamente relacionada con la calidad de los datos bioanalíticos subyacentes [23].

Antes del primer congreso sobre validación de métodos bioanalíticos existía una falta de uniformidad entre los criterios y la presentación de los datos a los organismos reguladores. El primer congreso de validación bioanalítica se organizó en 1990 y estaba dedicado a investigar y armonizar los procedimientos requeridos para validar los métodos. Éste congreso fue patrocinado por la Asociación



Americana de Científicos Farmacéuticos (AAPS), la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), la Federación Farmacéutica Internacional (FIP), la Oficina de Protección de la Salud (HPB) y la Asociación de Químicos Analíticos (AOAC). La conferencia se centró en los requisitos para la validación de los métodos bioanalíticos, los procedimientos para establecer la fiabilidad del método analítico, el desarrollo del método (pre-validación) y la aplicación del método (validación en el estudio). En el congreso se identificaron claramente dos fases distintas en la validación de métodos bioanalíticos [24]:

1. El desarrollo del método analítico (validación previa al estudio) implica el desarrollo del método con sus diversos parámetros y se divide en:
 - a) Desarrollo del método
 - b) Validación del método bioanalítico
2. La aplicación del método bioanalítico en el análisis de muestras de biodisponibilidad, bioequivalencia y estudios farmacocinéticos.

El producto de este trabajo se reflejó en la publicación de los acuerdos en la revista científica *Journal of Pharmaceutical Research* [25] y en otras revistas científicas adicionales [26, 27]. En 1999, se publicó una guía auspiciada por la FDA que reunía los avances en torno a este tema.

3.3.1 Desarrollo del método bioanalítico

El desarrollo de un método bioanalítico o etapa de prevalidación es una herramienta utilizada en el ámbito farmacocinético y biofarmacéutico; es una de las etapas que consumen más tiempo y esfuerzo para la generación del procedimiento. Es por ello, que se recomienda, como primer paso, reunir toda la información que pueda conducir, de manera exitosa, a la obtención del método bioanalítico. Entre los puntos que se deben tomar en consideración se encuentran:

- Las propiedades fisicoquímicas del analito
- Las concentraciones en el fluido biológico que se esperan
- El tipo de matriz biológica



- Las posibles interferencias con compuestos endógenos
- El estándar interno/externo
- Si el método es de carácter cualitativo o cuantitativo
- El límite de detección que se necesita
- El rango de concentraciones en el cual puede encontrarse el analito en la muestra
- Los requerimientos de órganos legislativos (FDA, EMA, SS)

El principio fisicoquímico del desarrollo de un método bioanalítico se inicia con el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y la matriz biológica en la cual se encuentra el analito. El conocimiento relativo de propiedades como el pKa, la solubilidad en varios disolventes como agua, metanol, acetonitrilo y hexano, entre otros, la estabilidad, el peso molecular y la polaridad son de vital importancia. Para seleccionar el detector adecuado se requiere conocer el intervalo de concentraciones esperadas y los máximos de absorción en el espectro UV que presenta el compuesto.

En este punto, y con la información recabada, se inicia el trabajo experimental del desarrollo en donde los experimentos empíricos y el diseño de experimentos son instrumentos que permiten encontrar las mejores condiciones para analizar el analito de interés. Es recomendable, antes de iniciar la validación formal, realizar un ensayo exploratorio (prevalidación) para determinar los valores de algunas directrices de la validación que permitan optimizarlo y visualizar el alcance del mismo [10].

3.3.2 Parámetros de validación

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el análisis de un analito es necesario evaluar si el proceso desarrollado se comporta de manera consistente. Ante la necesidad de asegurar que los resultados experimentales obtenidos durante un estudio son confiables surge el concepto de la validación de métodos analíticos [10].



La validación de un método involucra una serie de procedimientos experimentales que permiten demostrar que el método conducente a una determinación cuantitativa, en cierta matriz biológica, es confiable [25].

En 1994 [28] y en 1996 [29] la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, por sus siglas en inglés) emitió 2 documentos que describen los criterios generales referentes a la validación de métodos analíticos. Posteriormente, se celebró un segundo congreso de armonización referente a la validación de métodos bioanalíticos estableciéndose las diferentes categorías y los criterios de aceptación para los diferentes parámetros.

Una de las principales guías que la comunidad científica ha utilizado internacionalmente para validar métodos bioanalíticos es una guía titulada “*Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*” emitida por la FDA [30]. A continuación, se describen los requisitos que conforman las pruebas para demostrar que el método es confiable.

La validación en este documento se divide en tres categorías [10, 24, 30]:

- a) Validación completa: es el tipo de validación que debe realizarse cuando se desarrolla e implementa un método bioanalítico, por primera vez, para una nueva entidad farmacológica.
- b) Validación parcial: esta validación incluye modificaciones de métodos bioanalíticos validados que no requieren necesariamente de una revalidación completa, es decir, se aplica cuando un método previamente validado es modificado con ligeros cambios para cuantificar el analito de interés. Dependiendo del tipo de cambio se determinan específicamente los parámetros de validación que deben revalidarse.
- c) Validación cruzada: la validación cruzada es una comparación entre dos o más métodos bioanalíticos. Esta validación es necesaria cuando se utilizan dos o más métodos bioanalíticos para generar datos dentro del mismo estudio.



Los parámetros fundamentales que se requieren para demostrar que un método bioanalítico está validado son: la precisión, la exactitud, la selectividad, la sensibilidad (límite de cuantificación), la reproducibilidad y la estabilidad.

3.3.2.1 Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito de interés en presencia de otros componentes de la muestra. También, se debe proporcionar la evidencia que sustente que la sustancia cuantificada es el analito deseado [30]. Para realizar esta prueba es necesario analizar blancos de al menos 6 fuentes individuales de la matriz en cuestión (plasma, orina, sangre, etc.) para asegurar que ninguna sustancia interfiera con el tiempo de retención del analito en estudio [31]. Cada muestra (blanco) debe someterse a pruebas de interferencia y la selectividad debe asegurarse en el límite inferior de cuantificación (LLOQ).

3.3.2.2 Linealidad

Este parámetro indica la relación que existe entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. Esta relación debe ser continua y reproducible. Debe prepararse una curva de calibración en la misma matriz biológica que las muestras en estudio; el intervalo de trabajo deberá establecerse con base en las probables concentraciones del analito en el ensayo. Por otro lado, se recomienda que la curva cuente con un mínimo de seis niveles de concentración, un blanco (muestra de la matriz procesada) y una muestra cero (matriz procesada y estándar interno) [30].

La guía de la FDA no refiere directamente sobre un parámetro o valor específico para demostrar la linealidad [10]. Sin embargo, debe aplicarse una relación estadística que pueda describir de manera simple y adecuada la respuesta del instrumento con respecto a la concentración del analito. Las muestras en blanco y cero no deben considerarse para calcular los parámetros estadísticos.

En contraste, la *Guideline on bioanalytical method validation*, emitida por la EMA, establece que se deben reportar todas las curvas disponibles (o aceptables)



obtenidas durante la validación (mínimo 3). Las concentraciones calculadas deben estar dentro de $\pm 15\%$ del valor nominal, excepto para el LLOQ el cual debe estar dentro de $\pm 20\%$. Al menos el 75% de los estándares de calibración, con un mínimo de seis niveles, debe cumplir con este criterio **[30]**.

De manera general, la comunidad científica ha demostrado la linealidad de los métodos bioanalíticos evaluando el coeficiente de correlación (r) y/o el coeficiente de determinación (r^2). Algunos autores reportan también la variación de la ordenada al origen y la pendiente. Sin embargo, existe evidencia de que en algunos casos son insuficientes estos parámetros para determinar la linealidad y se recomienda hacer un análisis estadístico más exhaustivo **[10, 32]**.

3.3.2.3 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LLOQ, por sus siglas en inglés) es definido como la mínima concentración que el método bioanalítico puede determinar de manera precisa y exacta. El LLOQ debe aceptarse cuando se cumplen las siguientes condiciones:

- La respuesta del analito, en el LLOQ, debe ser al menos cinco veces la respuesta en comparación con la del blanco.
- La respuesta del analito en el LLOQ debe ser identificable, discreta y reproducible; además, la concentración calculada debe contar con una precisión aceptable (%CV menor al 20%) y una exactitud entre $\pm 20\%$ con respecto al valor nominal.

3.3.2.4 Exactitud

La exactitud de un método describe la cercanía de los resultados obtenidos experimentalmente con respecto a los valores (concentraciones) considerados como reales o teóricos. Este parámetro se determina mediante el análisis de al menos 5 muestras de concentración conocida (muestras QC), se recomienda un mínimo de tres concentraciones en el rango de la curva de calibración (puntos bajo, medio y alto). El coeficiente de variación (%CV) obtenido para cada nivel de concentración con respecto al valor nominal o teórico debe ser menor al 15%.



3.3.2.5 Precisión

La precisión de un método bioanalítico describe la cercanía de las medidas individuales de un analito cuando el procedimiento se aplica repetidamente a alícuotas múltiples. En este caso, la precisión debe medirse utilizando un mínimo de cinco determinaciones por concentración y empleando los puntos control (QC). La precisión determinada en cada nivel de concentración no debe exceder el 15% de variación (expresada como %CV), excepto, para el límite de cuantificación, donde no debe de exceder el 20% del CV.

El estudio de precisión se subdivide en repetibilidad y reproducibilidad. El primero también es conocido como intra-corrída, y se evalúa la variabilidad utilizando los QC, por quintuplicado, en un solo día. Por otro lado, la reproducibilidad es evaluada a través de la magnitud que relaciona la variación en los resultados observados por el efecto de uno o más factores tales como el tiempo, los analistas, los equipos e incluso los laboratorios. Cabe mencionar que la guía auspiciada por la ICH propone una “precisión intermedia” que expresa las variaciones obtenidas, en el laboratorio, debido a la aplicación del método en varios días; por cambio de analista; y uso de diferentes equipos, entre otros factores. También, define a la reproducibilidad como el grado de concordancia de los resultados experimentales entre los laboratorios [10, 33].

3.3.2.6 Recobro

El recobro de un analito en un ensayo es la comparación entre la respuesta del detector obtenida a partir de una cantidad del analito añadido y extraído a partir de la matriz biológica con la respuesta del detector obtenida para la concentración verdadera del analito preparada en fase móvil [31]. Este parámetro puede ser evaluado a partir del recobro absoluto o relativo [34]. En el primer caso, las muestras adicionadas con el analito son procesadas, según la metodología desarrollada, y registrando la respuesta analítica. Posteriormente, dicha respuesta se compara con la respuesta obtenida de aquellas muestras (preparadas a las mismas concentraciones, en fase móvil) que no sufrieron un proceso de extracción. El recobro relativo, tiene la finalidad de evaluar de manera indirecta el



efecto de sustancias que son co-extraídas de la matriz junto con el analito. Para ello, se preparan las muestras a ciertas concentraciones y se someten al proceso de extracción; de manera simultánea se preparan y extraen una serie de blancos de la matriz para adicionarles la cantidad del compuesto a las mismas concentraciones. Finalmente, se comparan las respuestas analíticas obtenidas [10].

Este parámetro debe realizarse comparando los resultados por quintuplicado en tres niveles de concentración. La guía de la FDA establece que, la recuperación del analito no debe ser del 100%, pero el grado de recuperación debe ser consistente, preciso y reproducible.

3.3.2.7 Estabilidad

La evaluación de la estabilidad debe llevarse a cabo para asegurar que cada paso tomado durante la preparación de la muestra, el análisis de la muestra y las condiciones de almacenamiento utilizadas no afecten la concentración del analito. Las pruebas de estabilidad deben evaluar la estabilidad de los analitos durante la recolección y manipulación de la muestra; después de un almacenamiento a corto y largo plazo y el efecto de los ciclos de congelación-descongelación. La guía de la FDA describe los siguientes tipos de estabilidades:

- a) Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación. Se preparan al menos tres muestras en dos niveles de concentración (alto y bajo). Posteriormente, se congelan a temperatura definida durante 12-24 h y se descongelan completamente a temperatura ambiente. Una vez descongelada la muestra se analiza y se somete a un nuevo ciclo de congelación. Esta operación se repite hasta completar tres ciclos [22].
- b) Estabilidad a corto plazo. Se preparan al menos tres muestras, en dos niveles de concentración (alto y bajo), y se mantienen a temperatura ambiente durante 4 a 24 horas. El intervalo de tiempo se define dependiendo del lapso que es necesario esperar para procesar desde la primera hasta la última muestra [22].



- c) Estabilidad a largo plazo. El proceso de estabilidad a largo plazo se realiza con base en la evaluación de la estabilidad de la muestra después de un periodo largo de almacenamiento. Para ello, se preparan muestras por triplicado en los niveles de concentración bajo y alto; las concentraciones de las muestras almacenadas después de procesarlas se comparan con la media de las concentraciones de aquellas que fueron analizadas en el primer día de estudio.
- d) Estabilidad del stock. La estabilidad del analito y el estándar interno en las soluciones primarias debe evaluarse por espacios mínimos de 6 horas a temperatura ambiente. El ensayo de estabilidad del stock se realiza relacionando la respuesta obtenida del analito o estándar interno después de un periodo establecido de horas, en ciertas condiciones, con la respuesta de soluciones de preparación reciente **[10]**.
- e) Estabilidad pospreparativa. Estas pruebas sirven para conocer la estabilidad de la muestra después de ser procesada. También, considera el tiempo en el cual las muestras se encuentran en el inyector del cromatógrafo de líquidos. Es recomendable realizar estudios estadísticos para determinar las estabilidades antes mencionadas **[10]**.



3.4 Marcadores de alta y baja permeabilidad

3.4.1 Metformina

Nombres químicos: 1,1-dimetilguanida, dimetilguanilguanidina, clorhidrato de metformina, hidrocloreuro de metformina, HCl-metformina.

Nombre Sistemático IUPAC: 3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina

Fórmula molecular: $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$

Peso molecular: 165.62 g/mol

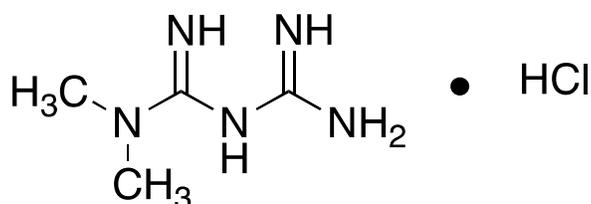


Figura 3.3 Estructura química de la metformina [35]

Descripción: Polvo blanco cristalino, soluble en agua (1.38 mg/mL) y metanol; prácticamente insoluble en acetona, éter y cloroformo. Tiene un punto de fusión de 223-226°C, un log P de -0.5. Es una molécula pequeña (129 Da), anfótera, con valores de pKa de 11.5 y 2.8. Estas características implican su alta solubilidad en agua y baja solubilidad en lípidos. Debido al carácter fuertemente básico del resto de guanidina (polar a pH 8) la metformina en condiciones fisiológicas existe en una forma protonada cargada de manera positiva. Los grupos hidrofílicos de la molécula son responsables de los cambios en el potencial de la membrana celular [36-39].

Historia: la metformina (N-1,1-dimetilbiguanida), tiene su origen histórico en una planta llamada *Galega officinalis*, conocida desde hace siglos en la medicina popular por su capacidad de reducir los efectos de la diabetes. En 1922 la molécula se sintetizó en Dublín como agente reductor de la glucosa en sangre. A finales de los años cincuenta se empleó en la clínica para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (no insulino-dependiente) [38,39].



Indicaciones terapéuticas: la metformina es un agente antihiper glucémico utilizado para tratar la diabetes mellitus no insulino-dependiente (NIDDM). Este fármaco mejora el control glucémico disminuyendo la producción de glucosa hepática y la absorción de la glucosa; también aumenta la captación de glucosa mediada por insulina. La metformina puede inducir la pérdida de peso y es el fármaco de primera línea para tratar pacientes obesos con NIDDM. Además, disminuye la glucosa plasmática en ayunas, los niveles de glucosa en sangre postprandial, la hemoglobina glicosilada (HbA1c) y puede tener un efecto positivo en los niveles de lípidos [39].

Actualmente, se está utilizando en pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP), en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólicas (EHNA) y en diabetes gestacional debido a que son enfermedades que presentan resistencia a la insulina. Sin embargo, estas indicaciones se consideran en etapa experimental [40].

Farmacocinética: después de una administración única por vía oral (a dosis de 0.5-1.5 g) en sujetos sanos, el fármaco se absorbe de forma incompleta en el tracto gastrointestinal y tiene una biodisponibilidad oral absoluta de 50-60% debido a que el fármaco experimenta un metabolismo de primer paso. Se ha observado que la metformina se une ligeramente a las proteínas plasmáticas y tiene un volumen de distribución de 4 L/Kg. Se elimina principalmente por secreción tubular renal activa y tiene una semivida de eliminación de 4-5 h [37, 40, 41].

Los estudios con dosis única y administración intravenosa, en sujetos sanos, demostraron que la metformina se excreta sin cambios en la orina y no experimenta metabolismo hepático (no se han identificado metabolitos en humanos) ni excreción biliar. Aproximadamente el 90% del fármaco se elimina en 24 horas en individuos con función renal sana. El aclaramiento renal de la metformina es aproximadamente 3.5 veces el de la depuración de creatinina indicando que la secreción tubular es el principal modo de eliminación de la metformina [39-41].



Mecanismo de acción: los mecanismos de acción de la metformina difieren de las otras clases de agentes antihiper glucémicos orales. La metformina disminuye la producción de glucosa hepática y la absorción intestinal de glucosa; también, incrementa la sensibilidad a la insulina aumentando la captación y el uso de la glucosa periférica. Estos efectos están mediados por la activación inicial de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK); una enzima hepática que desempeña un papel importante en la señalización de la insulina, en el equilibrio energético de todo el cuerpo y en el metabolismo de la glucosa. La activación de la AMPK es necesaria para que se produzca el efecto inhibitorio de la metformina sobre la producción de glucosa por las células hepáticas. El aumento en el uso de la glucosa periférica puede deberse a una mejor unión de insulina a sus receptores. La administración de metformina también aumenta la actividad de la AMPK en el músculo esquelético. Se sabe que la AMPK causa el despliegue de GLUT4, en la membrana plasmática, originando una captación de glucosa no insulino dependiente [40, 41].

Efectos adversos: uno de los efectos adversos más comunes de la metformina es la irritación gastrointestinal, que incluye diarrea, calambres, náuseas, vómitos y aumento de la flatulencia. Otro de los efectos secundarios potencialmente grave del uso de la metformina es la acidosis láctica; una complicación rara que en la mayoría de los casos parece estar relacionada con trastornos comórbidos como la alteración de la función hepática o renal, en lugar de la metformina misma [40]. También, se ha documentado que la metformina podría disminuir los niveles sanguíneos de la hormona estimulante de la tiroides, en personas con hipotiroidismo, pero aún se desconoce su mecanismo [40, 41].



3.4.2 Famotidina

Nombres químicos: Famotidina, Apogastina, Bestidina, Famodil, Gastridina, Brolin.

Nombre Sistemático IUPAC: 3 - [[2- (diaminometilidenamino) - 1,3 - tiazol - 4 - il] metilsulfanil] - N '- sulfamoilpropanimidamida

Fórmula molecular: C₈H₁₅N₇O₂S₃

Peso molecular: 337.45 g/mol

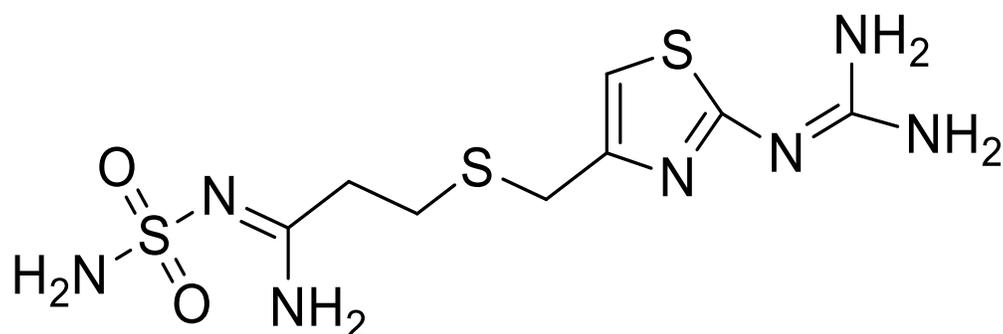


Figura 3.4 Estructura química de la famotidina [42]

Descripción: Polvo cristalino de color blanco a amarillo pálido, soluble en dimetilformamida, ácido acético glacial, levemente soluble en metanol, muy poco soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol, acetato de etilo y cloroformo, tiene un punto de fusión de 163-164 °C, un valor de log P de -0.57 a un pH de 9.2, y un pKa de 7.1 [42, 43].

Historia: Bovet y Staub, en 1937, demostraron por primera vez la actividad antihistamínica en una serie de aminas con una fracción de éter fenólico. En 1944, Bovet y colaboradores describieron el maleato de pirlamina, antagonista histaminico eficaz de dicha categoría. Poco después se descubrieron la difenhidramina y la tripelenamina altamente eficaces. En el decenio de 1980 se sintetizaron los antagonistas no sedantes del receptor histamínico H₁ para tratar



cuadros alérgicos. A pesar de los buenos resultados para bloquear la respuesta alérgica a la histamina, los antihistamínicos del tipo H₁ no inhibieron otras respuestas, en particular la secreción del ácido gástrico. El descubrimiento de los receptores H₂ y antagonistas de H₂ por parte de Black y colaboradores permitió contar con una nueva clase de agentes que antagonizaron la secreción ácida inducida por histamina como cimetidina y famotidina [44].

Indicaciones terapéuticas: Es un inhibidor de los receptores H₂. Este agente se recomienda para el tratamiento de corto plazo de la úlcera duodenal, la úlcera gástrica y el reflujo gastroesofágico. También, está indicado para el tratamiento de mantenimiento de la úlcera duodenal y el manejo de cuadros hipersecretorios, como el síndrome de Zollinger-Ellison y los adenomas endocrinos múltiples; la taquifilaxia compromete su uso prolongado [43, 45].

Farmacocinética: La famotidina se metaboliza en el hígado a famotidina S-óxido (S-Famotidina). El metabolito no parece inhibir la secreción ácida gástrica. La famotidina administrada por vía oral experimenta un metabolismo mínimo a través del hígado. La distribución en tejidos y fluidos del cuerpo humano no se ha caracterizado completamente. El volumen aparente de distribución del fármaco se indica que es de 1.1-1.4 L/Kg en adultos y no parece estar alterado sustancialmente en pacientes con disfunción renal. Después de la administración oral está ampliamente distribuida, apareciendo en concentraciones altas en riñón, hígado, páncreas y glándula submandibular. El fármaco se une de 15-20% a proteínas. Se excreta principalmente en la orina mediante filtración glomerular y secreción tubular. Aproximadamente, de 25-30 ó 65-80% de una dosis se excreta sin cambios en la orina dentro de las 24 horas siguientes a la administración oral o IV, respectivamente, el resto de la dosis administrada se elimina por vías metabólicas [45]. La concentración plasmática máxima se produce aproximadamente dos horas después de la administración oral. La biodisponibilidad de la famotidina es del 40 al 45%, y puede incrementarse ligeramente con alimentos o disminuirse un poco con antiácidos [46].



Mecanismo de acción: La famotidina se une competitivamente a los receptores H_2 situados en la membrana basolateral de la célula parietal en el estómago, bloqueando los efectos de la histamina. Esta inhibición competitiva da como resultado una reducción de la secreción basal y nocturna de ácido gástrico, el cual es liberado en respuesta a estímulos que incluyen alimentos, cafeína, insulina, betazol o pentagastrina [45-47].

Efectos adversos: Las reacciones adversas comunicadas en más del 1% incluyen cefaleas (4.7%), mareos (1.8%), constipación (1.2%) y diarrea (1.7%). Otras reacciones adversas que se han comunicado incluyen fiebre, astenia, fatiga, palpitaciones, náuseas, vómitos y malestar abdominal, anorexia, boca seca, anomalías en las enzimas hepáticas, trombocitopenia, edema de las órbitas, dolor, artralgias, parestesias, alteraciones psíquicas (depresión, ansiedad, disminución de la libido, alucinaciones, insomnio y somnolencia), broncoespasmos, alopecia, acné, prurito, erupción cutánea y rubor. Aunque los estudios de reproducción realizados en animales de laboratorio no aportaron evidencias de alteraciones de la fertilidad o daño del feto no se ha establecido la inocuidad de la famotidina en el embarazo o la lactancia [42, 43, 45].



4 METODOLOGÍA

4.1 Métodos bioanalíticos para cuantificar metformina y famotidina

4.1.1 Desarrollo del método

El desarrollo y la validación de los métodos bioanalíticos se llevó a cabo por medio de la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Para este propósito se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10A (VP); una bomba LC10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU 14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplados a un equipo de cómputo. El control del equipo así como el procesamiento de los datos obtenidos se realizaron utilizando el software LC solution.

Para realizar el análisis cromatográfico cuantitativo de la metformina se utilizó una columna Spherisorb ODS-2 (C18), con un tamaño de partícula de 5 μm , 150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno. Como sistema de elución se utilizó una fase móvil cuaternaria compuesta por agua (grado HPLC, Honeywell), MeOH (grado HPLC, Honeywell), ACN (grado HPLC, Honeywell) y trietilamina (Sigma Aldrich) en una proporción 60:20:20:0.05, ajustada a un pH de 2.9 con ácido fosfórico (85%), un flujo de 0.6 mL/min y un volumen de inyección de 20 μL . La longitud de onda utilizada fue de 225 nm.

Para el análisis cromatográfico de la famotidina se utilizó una columna LiChrospher 100 RP-18, con un tamaño de partícula de 5 μm , 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno. Como sistema de elución se utilizó una fase móvil ternaria compuesta por agua (grado HPLC, Honeywell), MeOH (grado HPLC, Honeywell) y trietilamina (Sigma Aldrich) en una proporción 80:20:0.05, ajustada a un pH de 2.9 con ácido fosfórico (85%), un flujo de 1.0 mL/min y un volumen de inyección de 20 μL . La longitud de onda utilizada fue de 287 nm.



Las soluciones de metformina y famotidina empleadas durante el desarrollo y la validación de los métodos bioanalíticos fueron preparadas utilizando estándares marca Sigma-Aldrich con una pureza de 99.8% y 99.0%, respectivamente.

4.1.2 Diseño de experimentos para el desarrollo de los métodos cromatográficos.

Para encontrar las condiciones cromatográficas óptimas de los métodos propuestos se realizó un diseño de experimentos factorial 2^3 . Los factores se seleccionaron considerando la información previamente descrita en la literatura sobre métodos analíticos para cuantificar ambos fármacos [48]. Así, los factores evaluados para la metformina fueron: la proporción de H_2O , el pH de la fase móvil y el flujo, mientras que, para la famotidina fueron: la proporción de MeOH, el pH de la fase móvil y el flujo. Los niveles de cada uno de los factores se resumen en las **Tablas 4.1 y 4.2.**

Tabla 4.1 Factores y niveles evaluados en el diseño experimental para la metformina

Factor	Nivel alto	Nivel bajo
Proporción de H_2O (%)	70	50
pH de la fase móvil	3.11	2.73
Flujo (mL/min)	1.0	0.6

Tabla 4.2 Factores y niveles evaluados en el diseño experimental para la famotidina

Factor	Nivel alto	Nivel bajo
Proporción de MeOH (%)	30	10
pH de la fase móvil	3.11	2.73
Flujo (mL/min)	1.1	0.9

La aleatorización del diseño se realizó utilizando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI. Las respuestas evaluadas para el diseño de experimentos fueron: tiempo de retención, factor de coeio y área del pico obtenido;



también se evaluó la influencia de cada uno de los factores sobre las respuestas mencionadas anteriormente.

En todos los experimentos llevados a cabo para el desarrollo del método se utilizó una solución de metformina o famotidina, en fase móvil, a una concentración de 10 µg/mL.

4.1.3 Preparación de soluciones

4.1.3.1 Soluciones stock

Las soluciones stock del estándar de metformina y famotidina se prepararon a una concentración de 1000 µM utilizando como diluyente H₂O y MeOH, respectivamente.

4.1.3.2 Solución de Hank (HBSS)

La pre-mezcla de sales de Hank (MP Biomedicals, LLC, 1710120); 0.35 g de bicarbonato de sodio (JT Baker) y 5.96 g de HEPES sal de sodio (Sigma Aldrich) se disolvieron en 980 mL de agua (grado HPLC, Honeywell). Posteriormente, se ajustó el pH a 7.4 con HCl o NaOH 1 M y se completó el volumen a 1 L con agua. La solución se conservó en refrigeración y en un frasco ámbar.

4.1.4 Evaluación del sistema

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se evaluó la adecuabilidad, la linealidad y la precisión del sistema. Para ello, se diluyó convenientemente la solución stock usando la fase móvil como diluyente.

4.1.4.1 Adecuabilidad

La adecuabilidad del sistema se determinó analizando cinco inyecciones de una solución de metformina o famotidina a una concentración de 10 µg/mL. Para cada inyección se calculó el factor de capacidad, la resolución, el factor de coe y el número de platos teóricos. Finalmente, se calculó el CV entre las réplicas.

4.1.3.2 Precisión

La precisión del sistema se llevó a cabo por medio del análisis de seis réplicas en tres niveles de concentración. Para la metformina los tres niveles de concentración



fueron: 45, 105 y 130 μM , mientras que, para la famotidina fueron: 15, 40 y 70 μM . Cada una de las réplicas se preparó de forma independiente a partir de la solución stock (1000 μM); las diluciones empleadas se resumen en las **Tablas 4.3 y 4.4**.

Tabla 4.3 Diluciones realizadas para preparar los puntos control (QCs) de la metformina

Nivel de concentración	Volumen de alícuota (μL)	Aforo con FM (mL)	Concentración final (μM)
Bajo	450	10	45
Medio	1050	10	105
Alto	1300	10	130

Tabla 4.4 Diluciones realizadas para preparar los puntos control (QCs) de la famotidina

Nivel de concentración	Volumen de alícuota (μL)	Aforo con FM (mL)	Concentración final (μM)
Bajo	150	10	15
Medio	400	10	40
Alto	700	10	70

4.1.3.3 Linealidad

La linealidad del sistema se determinó por medio del análisis de tres curvas de calibración. Para la metformina los niveles de concentración fueron: 15, 25, 35, 60, 70, 90, 100, 110, 120 y 140 μM , y para la famotidina fueron: 5, 10, 20, 30, 50, 60 y 90 μM . Cada curva se preparó mediante diluciones independientes a partir de la solución stock (**Tablas 4.5 y 4.6**). Con la respuesta analítica obtenida se realizó una regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados calculando la ordenada al origen, la pendiente de la recta, el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r).



Tabla 4.5 Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración de la metformina

Nivel de concentración	Volumen de alícuota (μL)	Aforo con FM (mL)	Concentración final (μM)
1	150	10	15
2	250	10	25
3	350	10	35
4	600	10	60
5	700	10	70
6	900	10	90
7	1000	10	100
8	1100	10	110
9	1200	10	120
10	1400	10	140

Tabla 4.6 Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración de la famotidina

Nivel de concentración	Volumen de alícuota (μL)	Aforo con FM (mL)	Concentración final (μM)
1	50	10	5
2	100	10	10
3	200	10	20
4	300	10	30
5	500	10	50
6	600	10	60
7	900	10	90

4.1.5 Validación de los métodos bioanalíticos

La validación de los métodos bioanalíticos se llevó a cabo de acuerdo con los criterios establecidos en la guía de validación de métodos bioanalíticos “*Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*”, emitida por la FDA, en septiembre del 2013. De acuerdo con esta guía, los parámetros de desempeño a evaluar durante la validación de un método bioanalítico en su modalidad cromatográfica



son: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, recobro, límite de cuantificación y estabilidad de la muestra.

Todas las soluciones empleadas durante la validación de los métodos bioanalíticos se prepararon a partir de la solución stock utilizando como diluyente la solución de Hank pH 7.4.

4.1.5.1 Linealidad

Se determinó por medio del análisis de los datos obtenidos de seis curvas de calibración, preparadas en diferentes días, en los intervalos de 15 a 140 μM y de 5 a 90 μM para la metformina y la famotidina, respectivamente. Los niveles de concentración empleados fueron 15, 25, 35, 60, 70, 90, 100, 110, 120 y 140 μM para la metformina y de 5, 10, 20, 30, 50, 60 y 90 μM para la famotidina. El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI; los parámetros calculados, en cada caso, fueron la ordenada al origen, la pendiente de la recta, el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r).

4.1.5.2 Exactitud, precisión y recobro

Para evaluar estos parámetros del método se prepararon de manera independiente 5 muestras en tres niveles de concentración: 45 μM (nivel bajo), 105 μM (nivel medio) y 140 μM (nivel alto) para la metformina y 15 μM (nivel bajo), 40 μM (nivel medio) y 70 μM (nivel alto) para la famotidina.

La exactitud del método se determinó calculando, en primer lugar, la concentración recuperada por muestra y el valor promedio entre las réplicas. Una vez obtenido el valor promedio se determinó la diferencia con respecto al valor nominal de cada concentración evaluada.

Por otra parte, la precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se determinó mediante el cálculo del coeficiente de variación entre las réplicas de la concentración recuperada para cada muestra y en los diferentes niveles de concentración; mientras que, la precisión intermedia



se determinó estimando la variación entre la concentración recuperada de muestras preparadas en días y por analistas diferentes.

Finalmente, para evaluar el recobro se prepararon 5 muestras adicionales, en los tres niveles de concentración y utilizando fase móvil como diluyente. Con los datos obtenidos se comparó la respuesta analítica obtenida entre las muestras preparadas con fase móvil y las muestras preparadas con la solución de Hank.

4.1.5.3 Limite de cuantificación

Para calcular el límite de cuantificación se prepararon diluciones seriadas hasta obtener la concentración mínima que presentara: una respuesta analítica identificable de por lo menos cinco veces la señal de ruido, un coeficiente de variación no mayor al 20% y una exactitud en la concentración recuperada del $\pm 20\%$. Para ello, se analizaron los resultados de cinco inyecciones en el sistema cromatográfico.

4.1.5.4 Estabilidad

La estabilidad de la muestra se evaluó en solución de Hank pH 7.4, a corto y a largo plazo así como, en tres ciclos de congelación-descongelación.

- **Estabilidad de la muestra a corto plazo**

Para evaluar este parámetro se prepararon muestras, por triplicado, en los siguientes niveles de concentración: 45, 105 y 130 para la metformina y 15, 40 y 70 μM para la famotidina. Previo a su almacenamiento a temperatura ambiente durante 24 horas, las muestras fueron analizadas en el sistema cromatográfico (condición inicial). Con los datos obtenidos se calculó la concentración recuperada, la desviación absoluta con respecto al valor nominal y la desviación estándar.

- **Estabilidad de la muestra a largo plazo**

La estabilidad de la muestra a largo plazo se evaluó empleando la metodología mencionada en el párrafo anterior, excepto, que el almacenamiento de las muestras se realizó a -47°C durante un periodo de 30 días.



- **Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación**

Para evaluar este parámetro las muestras se analizaron empleando tres ciclos de congelación-descongelación. De la misma manera, se prepararon muestras en los tres niveles de concentración y se analizaron con la metodología utilizada para evaluar la estabilidad a corto y largo plazo. Posteriormente, las muestras se congelaron a -47°C durante 24 horas; al término de este periodo las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Esta etapa representa el término del primer ciclo. Una vez descongeladas las muestras, se analizó un alícuota con el método bioanalítico desarrollado; el resto de la solución se almacenó de nueva cuenta a -47°C para iniciar el segundo ciclo. Este procedimiento se repitió hasta completar los tres ciclos de congelación-descongelación. Finalmente, con los datos analíticos obtenidos en cada ciclo se calculó la concentración recuperada, su desviación absoluta con respecto al valor nominal y la desviación estándar.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Métodos bioanalíticos para cuantificar metformina y famotidina

5.1.1 Desarrollo de los métodos bioanalíticos

Para el desarrollo del método bioanalítico se tomaron como base algunos de los métodos cromatográficos descritos en la literatura [49-57]. Con base en las condiciones cromatográficas reportadas se evaluaron distintas columnas, diferentes sistemas de elución y distintos valores de pH hasta obtener las condiciones cromatográficas que permitieron observar un pico con características cercanas a un comportamiento gaussiano simétrico.

Por otro lado, para establecer la longitud de onda de máxima absorción tanto para la metformina como para la famotidina se registró un espectro de absorción en el UV, de una solución de referencia preparada con fase móvil, en el intervalo espectral de 200-400 nm (**Figuras 5.1 y 5.2**). De acuerdo con los resultados obtenidos la metformina presenta máximos de absorción a 235 y 210 nm, mientras que, la famotidina presenta máximos de absorción a 287 y 214 nm.

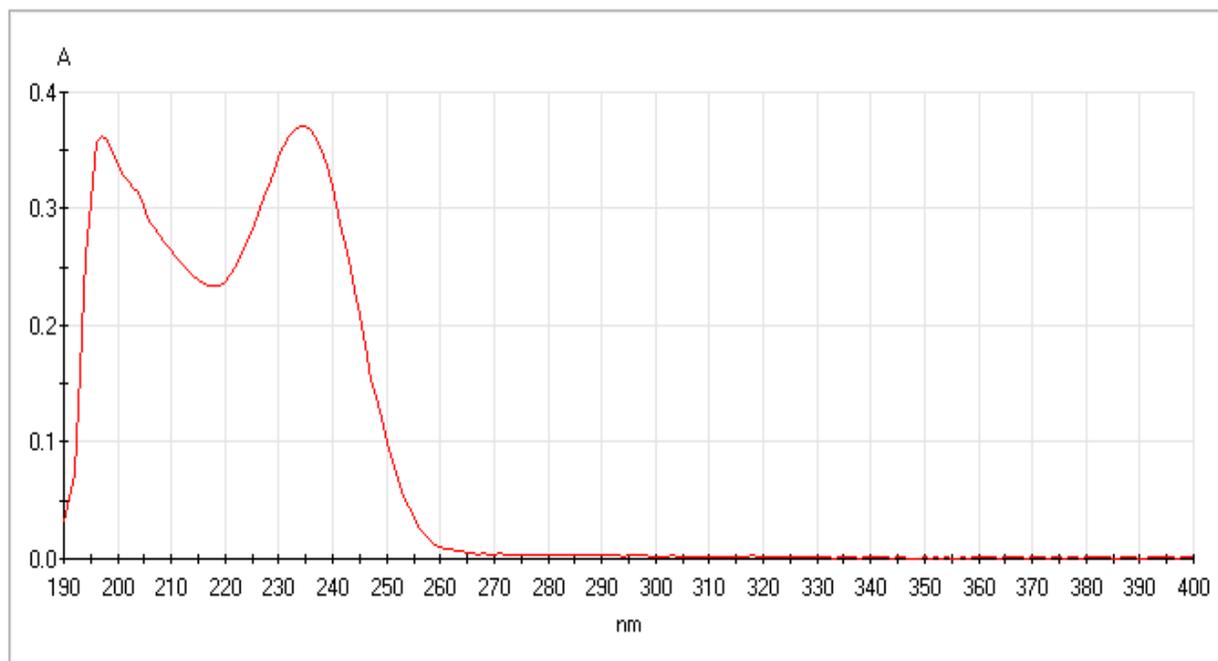


Figura 5.1 Espectro de absorción en el UV para la metformina

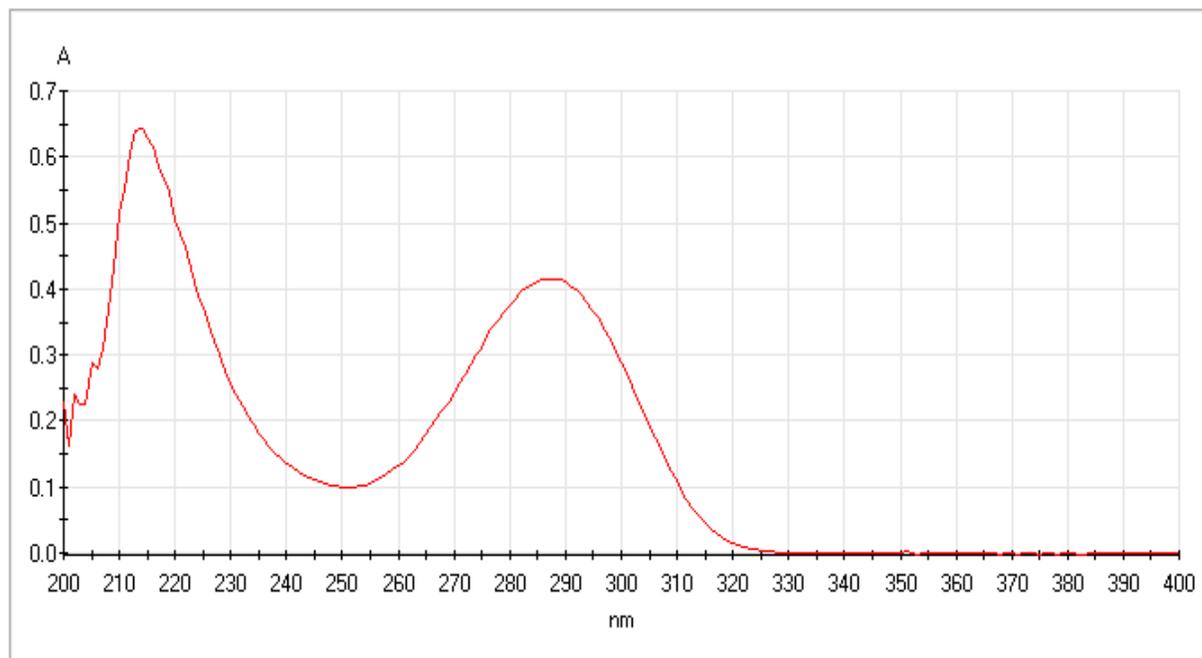


Figura 5.2 Espectro de absorción en el UV para la famotidina

La longitud de onda utilizada para la metformina y la famotidina fue 225 nm y 287 nm respectivamente, ya que, a esa longitud de onda la señal analítica no resultaba ser afectada por el ruido instrumental.

Posteriormente, para establecer las condiciones cromatográficas óptimas del método de cuantificación se realizó un diseño de experimentos factorial 2^3 .

Los diseños factoriales se usan ampliamente en experimentos que incluyen varios factores cuando es necesario estudiar el efecto conjunto de los factores sobre una respuesta. El diseño puede aplicarse entonces, para mejorar el desempeño o bien, para obtener procesos robustos a las fuentes de variabilidad externas [58].

Los factores evaluados para la metformina fueron: la proporción de H_2O , el pH de la fase móvil y el flujo; para la famotidina fueron: la proporción de MeOH, el pH de la fase móvil y el flujo. Por otro lado, los niveles alto y bajo de cada factor se seleccionaron con base en las recomendaciones publicadas en la USP 37 para métodos cromatográficos [48].



5.1.1.1 Diseño de experimentos factorial para la metformina [58]

En la **Tabla 5.1** se resume la aleatorización del diseño así como los valores obtenidos para el factor de coleo del pico en las diferentes condiciones de análisis.

Tabla 5.1 Aleatorización del diseño factorial y resultados obtenidos para evaluar el factor coleo del pico.

Número de análisis	Proporción de H ₂ O	pH de la fase móvil	Flujo (mL/min)	Factor Coleo
1	50	3.11	1.0	1.984
2	70	3.11	1.0	1.897
3	50	3.11	0.6	1.993
4	70	2.73	1.0	1.794
5	70	3.11	0.6	1.919
6	50	2.73	0.6	1.885
7	50	2.73	1.0	1.875
8	70	2.73	0.6	1.853
9	50	3.11	1.0	1.968
10	70	3.11	1.0	1.907
11	50	3.11	0.6	1.982
12	70	2.73	1.0	1.781
13	70	3.11	0.6	1.903
14	50	2.73	0.6	1.836
15	50	2.73	1.0	1.859
16	70	2.73	0.6	1.855

Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar el siguiente modelo factorial:

Factor coleo: $0.676562 + 0.41875 \cdot \text{pH} - 0.165345 \cdot \text{Flujo} + 0.0129595 \cdot \text{Proporción de agua en la fase móvil} + 0.129934 \cdot \text{pH} \cdot \text{Flujo} - 0.00424342 \cdot \text{pH} \cdot \text{Proporción de agua en la fase móvil} - 0.00440625 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Proporción de agua en la fase móvil}$.

En la **Tabla 5.2** se resumen los valores obtenidos del análisis de varianza del modelo. Como se observa en la información presentada, el valor obtenido en la



prueba F para el significado de la regresión en cada factor se encuentra entre 5.26 y 134.79, cabe mencionar que el valor más alto de F corresponde al pH de la fase móvil. Por otro lado, el valor P estimado para los factores es menor a 0.05, excepto para el flujo. Asimismo, en las interacciones entre los factores, se observa que el valor de F para la interacción BC es mayor que el de las interacciones AC y BC, además, el valor P estimado para todas las interacciones es mayor a 0.05. Estos hallazgos permiten concluir, con el 95% de confianza, que tanto el flujo como las interacciones no afectan de manera significativa el factor de coleo del pico.

En la **Gráfica 5.1** se puede observar que los principales factores que afectan el factor de coleo son el pH y la proporción de agua en la fase móvil. En contraste, la **Grafica 5.2** ilustra que, ninguno de los factores presenta una interacción significativa.

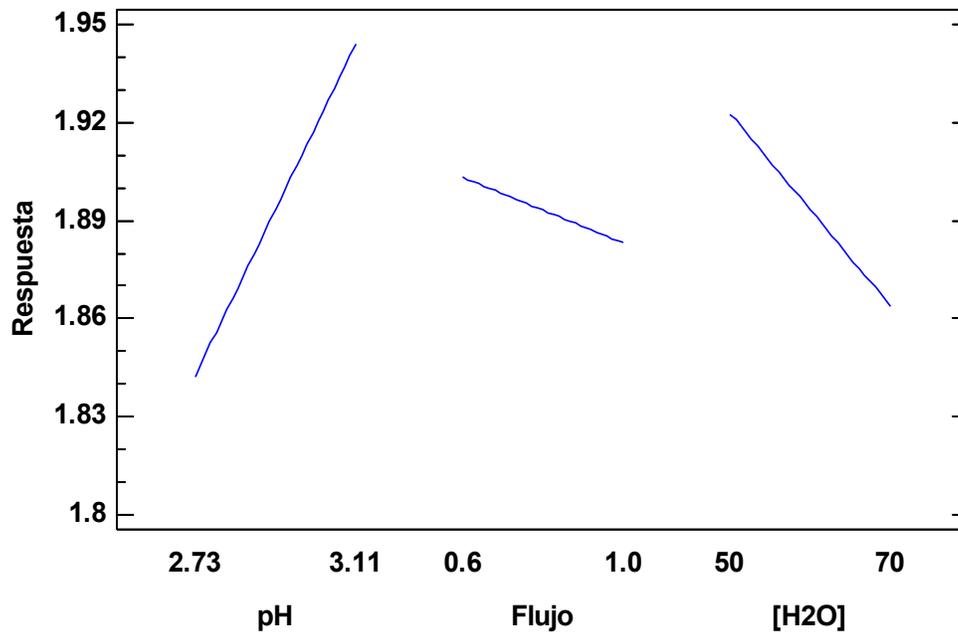
Finalmente, la **Figura 5.3** representa el diagrama de Pareto de los factores evaluados en el diseño. De manera general, el diagrama concuerda con las conclusiones mencionadas anteriormente, es decir, el factor de coleo es afectado por el pH y la proporción de agua en la fase móvil.



Tabla 5.2 Análisis de varianza para el modelo

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: pH	0.0415141	1	0.0415141	134.79	0.0000
B: Flujo	0.00162006	1	0.00162006	5.26	0.0510
C: [H ₂ O]	0.0139831	1	0.0139831	45.40	0.0001
AB	0.000390063	1	0.000390063	1.27	0.2931
AC	0.00104006	1	0.00104006	3.38	0.1034
BC	0.00124256	1	0.00124256	4.03	0.0795
Bloques	0.000742562	1	0.000742562	2.41	0.1591
Error Total	0.002464	8	0.000308		
Total (corr.)	0.0629964	15			
R ²	96.0887 %				
R ² (ajustada por g.l)	92.6663 %				

Gráfica 5.1 Gráfica de efectos principales





Gráfica de interacción para var_1

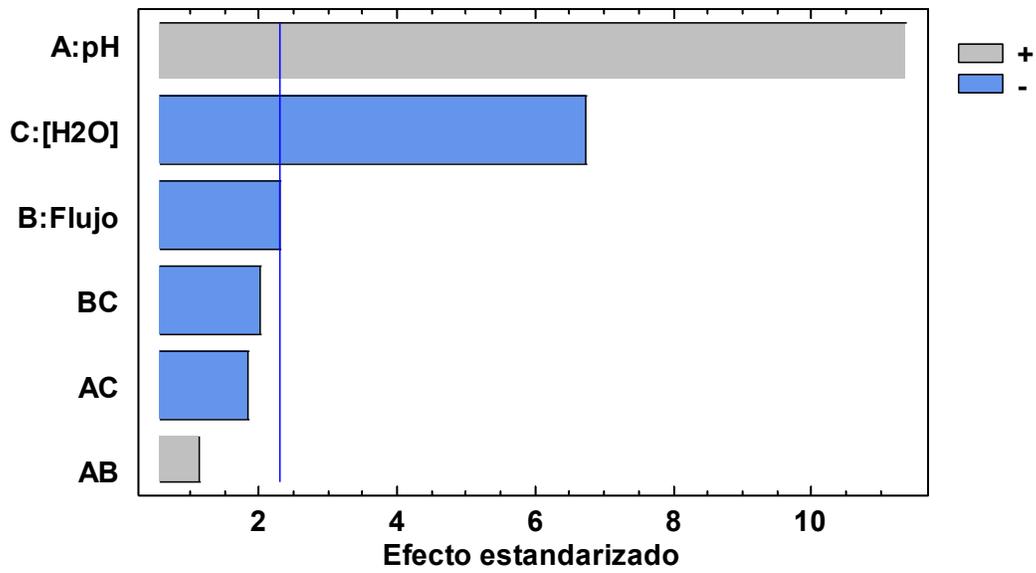
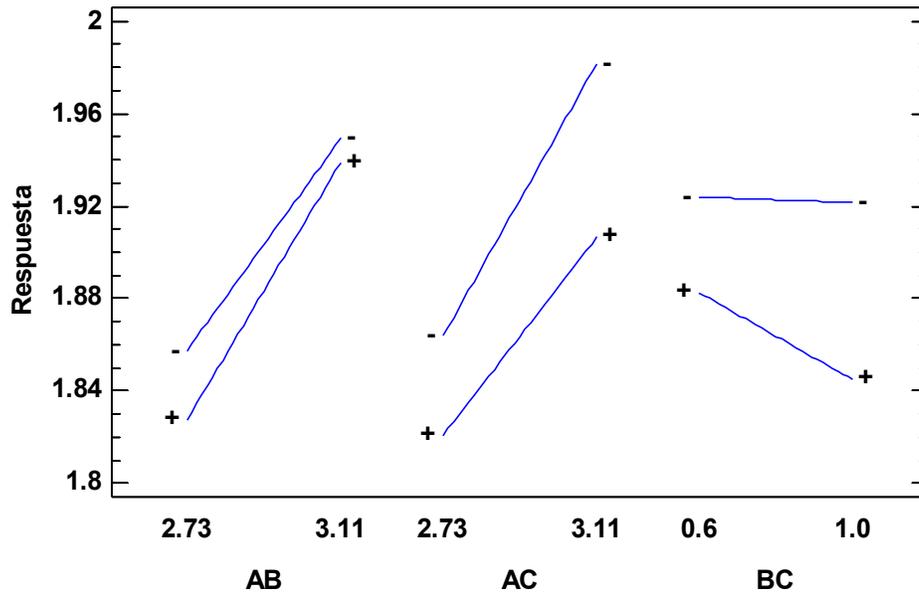


Figura 5.3 Diagrama de Pareto de los factores evaluados

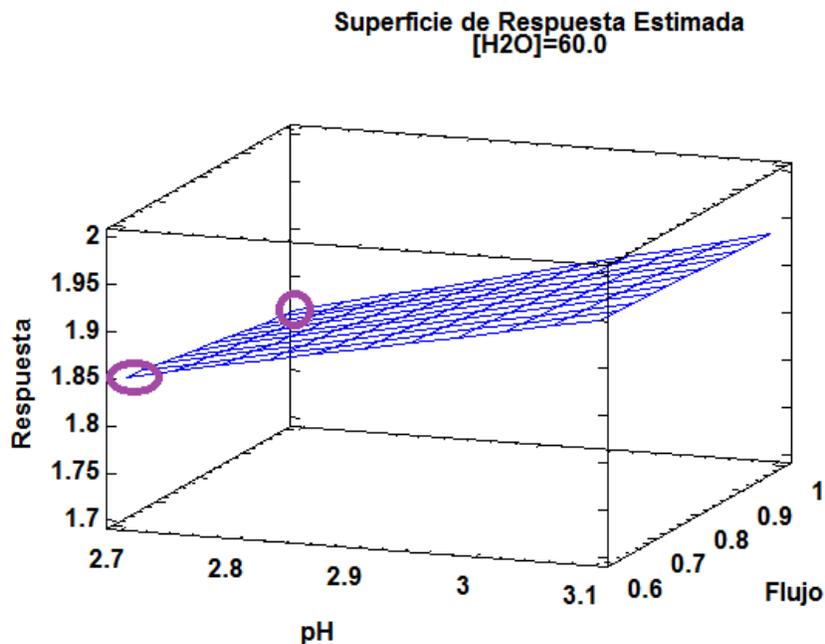


Con respecto a las gráficas de superficie y de contornos de la superficie de la respuesta estimada (**Figuras 5.4a** y **5.4b**, respectivamente) es importante mencionar que de acuerdo con el modelo establecido el factor de coleo óptimo se obtiene con una proporción del 60% de agua en la fase móvil, un rango de pH entre 2.7-2.9 y un flujo de 0.6-1.0 mL/min.

Por otro lado, empleando la gráfica de contornos de superficie de la respuesta estimada a un flujo de 1.0 mL/min (**Figura 5.5a**) es posible establecer que el menor valor para el factor de coleo se obtiene en un rango de pH de 2.7-2.9 y una proporción de 50-70% de agua en la fase móvil. En este contexto, cuando el pH tiene un valor de 2.92 (**Figura 5.5b**) la mejor respuesta se obtiene con rangos entre 60-70% para la proporción de agua en fase móvil y 0.6-1.0 mL/min para el flujo.



(a)



(b)

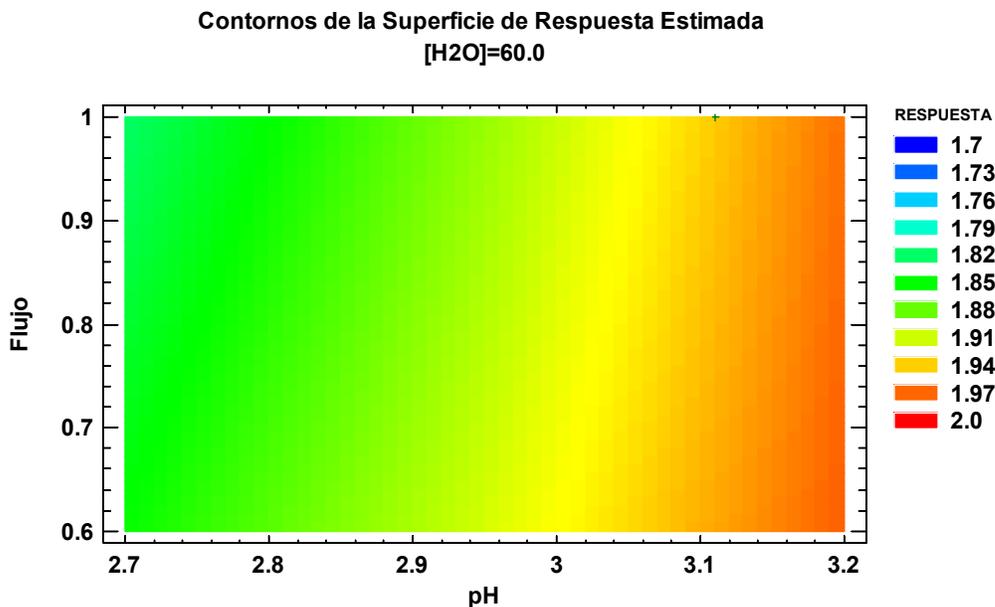
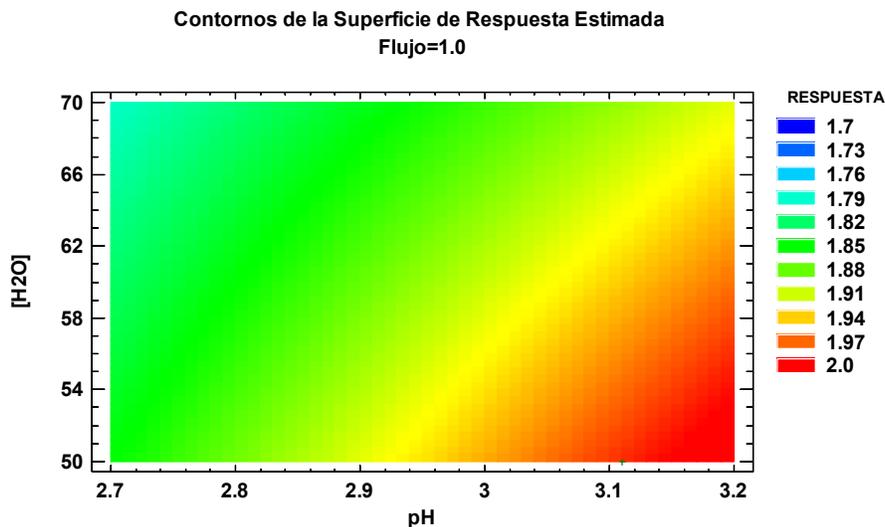


Figura 5.4 Gráficas de superficie de respuesta estimada (a) Cubo de superficie de la respuesta estimada fijando la proporción de agua (factor C) al 60%. (b) Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada fijando la proporción de agua al 60%.



(a)



(b)

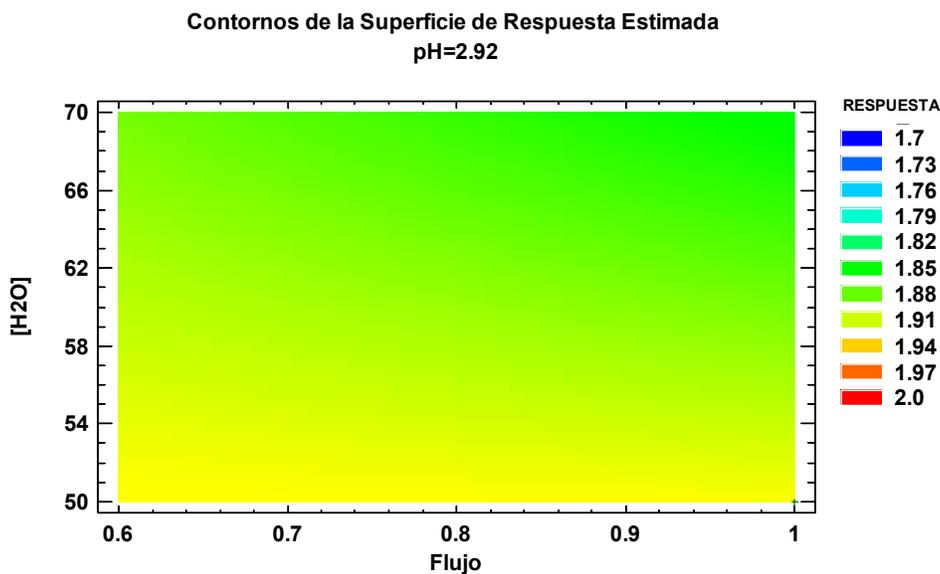


Figura 5.5 Gráficas de superficie de respuesta estimada (a) Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada fijando el flujo (factor B) a 1.0 mL/min. (b) Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada fijando el pH (factor A) a 2.92 unidades.



En síntesis, el diseño de experimentos permite maximizar la respuesta por medio de la combinación de los tres factores. En este caso, las condiciones óptimas de trabajo para obtener un factor de coelución de 1.98 son: un pH de 3.11, un flujo de 1.0 mL/min y una proporción de agua en la fase móvil del 50%.

Finalmente, con base en estas consideraciones, las condiciones cromatográficas seleccionadas para validar la metodología analítica se resumen en la **Tabla 5.3**. En la **Figura 5.6** se muestra un cromatograma obtenido para la metformina empleando el método cromatográfico desarrollado.

Tabla 5.3 Condiciones cromatográficas para cuantificar metformina

Fase móvil	ACN:MeOH:H₂O:TEA (20:20:60:0.05)
Columna	Spherisorb ODS2 (C18) 5 µm, 4.6 x 250 mm
pH de la fase móvil	2.92
Flujo (mL/min)	0.6 mL/min
Vol. de inyección	20 µL
Longitud de onda	225 nm y 287 nm
Temperatura	Ambiental

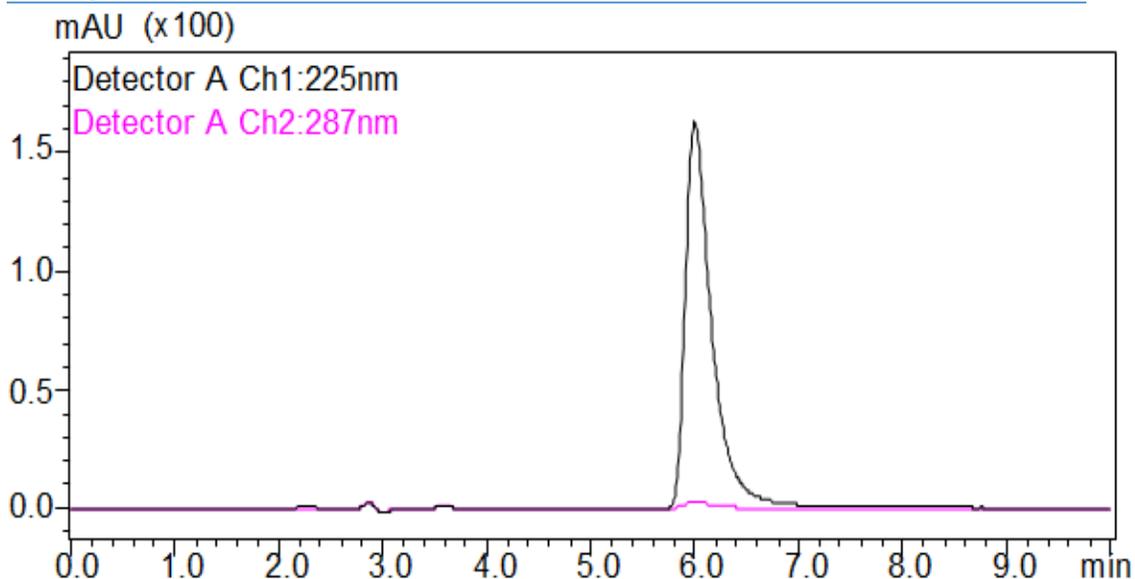


Figura 5.6 Cromatograma obtenido para la metformina a una concentración de 140 µM



5.1.1.2 Diseño de experimentos factorial para la famotidina [58]

Para calcular el modelo correspondiente a la famotidina se utilizó el procedimiento descrito anteriormente para la metformina. En este caso, los factores evaluados fueron la proporción de MeOH, el pH de la fase móvil y el flujo. En la **Tabla 5.4** se resume la aleatorización del diseño así como los valores obtenidos para el factor de coleo del pico en las diferentes condiciones de análisis.

Tabla 5.4 Aleatorización del diseño factorial y resultados obtenidos para evaluar el factor coleo del pico.

Número de análisis	Proporción de MeOH	pH de la fase móvil	Flujo (mL/min)	Factor Coleo
1	10	2.73	1.1	1.065
2	10	2.73	0.9	1.08
3	30	2.73	0.9	1.288
4	10	3.11	1.1	1.079
5	10	3.11	0.9	1.075
6	30	3.11	1.1	1.305
7	30	3.11	0.9	1.295
8	30	2.73	1.1	1.288
9	10	2.73	1.1	1.068
10	10	2.73	0.9	1.057
11	30	2.73	0.9	1.290
12	10	3.11	1.1	1.050
13	10	3.11	0.9	1.094
14	30	3.11	1.1	1.306
15	30	3.11	0.9	1.283
16	30	2.73	1.1	1.299

En las **Tablas 5.5, 5.6 y 5.7** se resumen el modelo factorial, el análisis de varianza, y las principales gráficas obtenidas a partir del diseño factorial.



Tabla 5.5 Modelo factorial estimado y análisis de varianza para el modelo

Modelo Factorial:

Factor coleo:

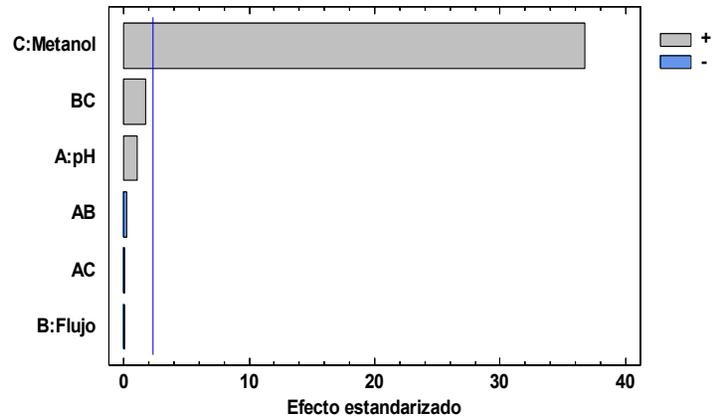
$0.89523 + 0.0592105 \cdot \text{pH} + 0.00651316 \cdot \text{Flujo} + 0.00617171 \cdot \text{Proporción de metanol en la fase móvil} - 0.0394737 \cdot \text{pH} \cdot \text{Flujo} - 0.000131579 \cdot \text{pH} \cdot \text{Proporción de metanol en la fase móvil} + 0.005375 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Proporción de metanol en la fase móvil}$.

Análisis de varianza para el modelo:

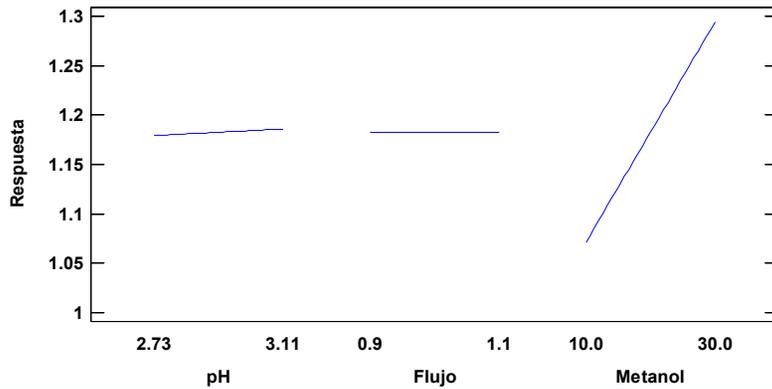
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: pH	0.000169	1	0.000169	1.14	0.3159
B: Flujo	2.5×10^{-7}	1	2.5×10^{-7}	0.00	0.9682
C: Metanol	0.199362	1	0.199362	1350.46	0.0000
AB	0.000009	1	0.000009	0.06	0.8112
AC	0.000001	1	0.000001	0.01	0.9364
BC	0.00046225	1	0.00046225	3.13	0.1148
Bloques	0.000049	1	0.000049	0.33	0.5804
Error Total	0.001181	8	0.000147625		
Total (corr.)	0.201234	15			
R2	99.4131 %				
R2 (ajustada por g.l)	98.8996 %				

Tabla 5.6 (a) Diagrama de Pareto de los factores evaluados, (b) Gráfica de los efectos principales para la respuesta, (c) Interacciones entre los factores del diseño experimental.

(a)



(b)



(c)

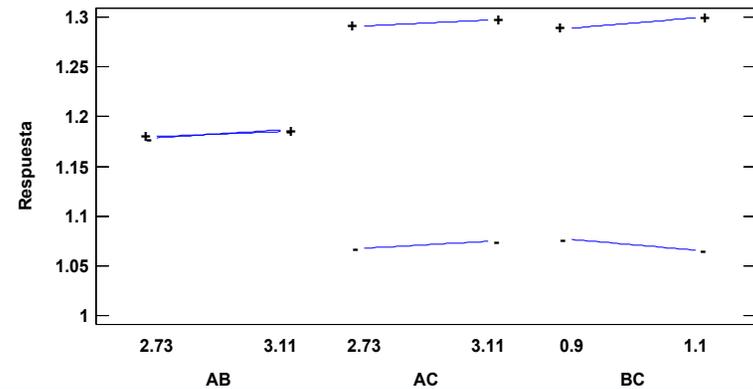
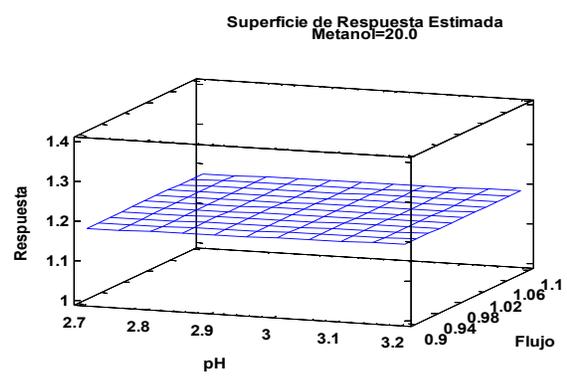


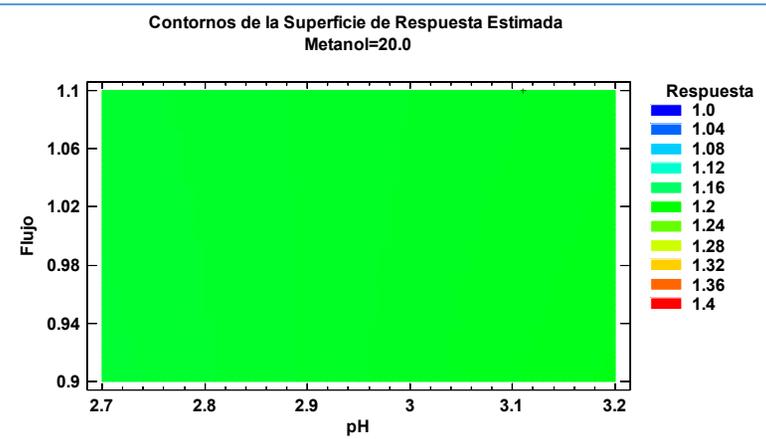


Tabla 5.7 (a) Grafica de superficie estimada y (b), (c), (d) Gráficas de contornos de la superficie de respuesta estimada.

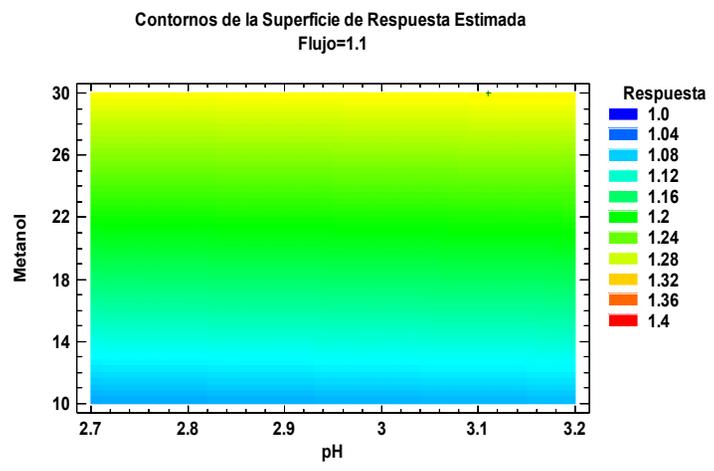
(a)



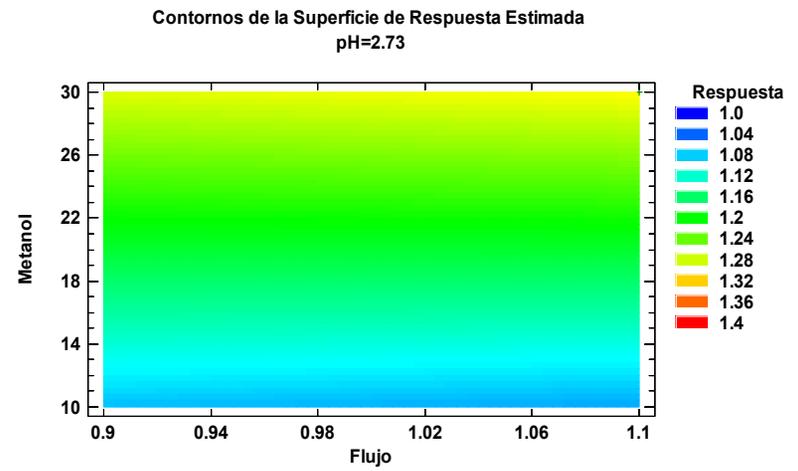
(b)



(c)



(d)





Considerando lo antes expuesto, el mejor factor de coeico para el pico se obtiene empleando un pH de 3.11, un flujo de 1.1 y una proporci3n de metanol en la fase m3vil del 10%. Cabe mencionar, que pueden modificarse debido a que un aumento en el componente 3cido de la fase m3vil daaari3a la columna.

Finalmente, las condiciones cromatogr3ficas seleccionadas para validar la metodolog3a anal3tica se resumen en la **Tabla 5.8**. En la **Figura 5.7** se muestra un cromatograma obtenido para la famotidina empleando el m3todo cromatogr3fico desarrollado.

Tabla 5.8 Condiciones cromatogr3ficas para validar el m3todo

Fase m3vil	MeOH:H ₂ O:TEA (20:80:0.05)
Columna	LiChrospher 100 RP-18, 5 μm, 4.6 x 250 mm
pH de la fase m3vil	2.92
Flujo (mL/min)	1.0 mL/min
Vol. de inyecci3n	20 μL
Longitud de onda	287 nm y 233 nm
Temperatura	Ambiental

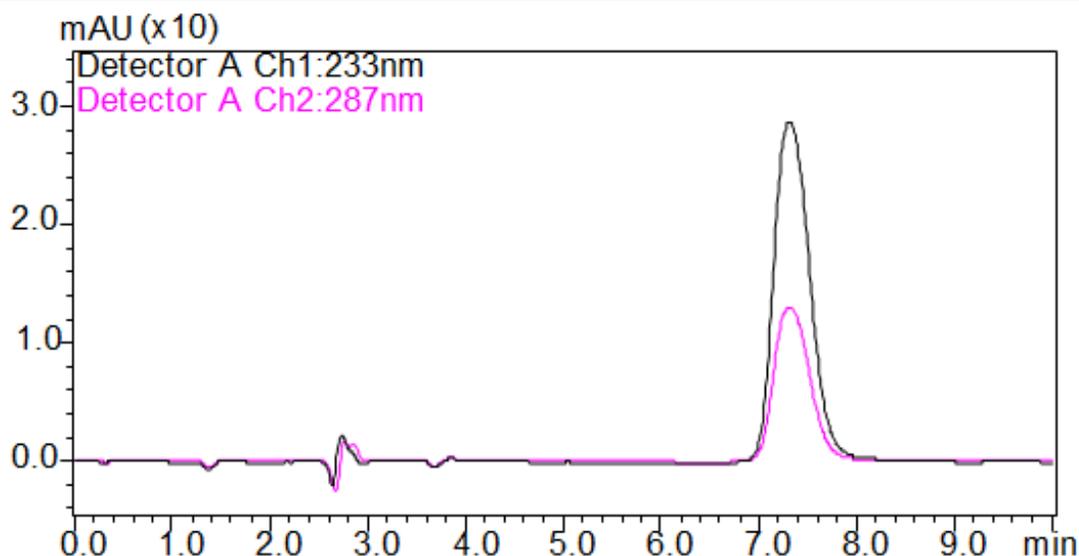


Figura 5.7 Cromatograma obtenido para la famotidina a una concentraci3n de 90μM



5.1.2 Evaluación del sistema

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas de trabajo, se desarrolló el protocolo de validación del método. Para ello, en primer lugar, se evaluó el sistema cromatográfico. Si bien, este parámetro de calidad no es requisito en la guía de validación de métodos bioanalíticos “*Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*”, en este trabajo, se evaluó la adecuabilidad con la finalidad de establecer la confiabilidad del sistema cromatográfico antes de procesar las muestras durante el uso rutinario del método [59].

5.1.2.1 Adecuabilidad

La adecuabilidad del sistema es una parte integral de muchos procedimientos analíticos, incluyendo los cromatográficos. Este parámetro permite establecer que el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema analítico adecuado para la ejecución del análisis [59].

La evaluación de este parámetro se llevó a cabo por medio del análisis de la respuesta obtenida con cinco inyecciones de una misma muestra; con los resultados obtenidos se calculó el CV entre las réplicas, el factor de capacidad (k'), la resolución (R), el factor de coqueo (T) y el número de platos teóricos.

El factor de capacidad (k') es una medida del grado de interacción del analito con la fase estacionaria y, su valor puede ajustarse modificando la fuerza de elución de la fase móvil hasta que, el valor del factor de capacidad (k') se encuentre dentro del intervalo entre 2 y 10. Este factor se emplea tanto para evaluar la retención como para ajustar la separación de los analitos [60].

El factor de coqueo (T) es una medida de la simetría del pico. Cuando se incrementa el coqueo de un pico cromatográfico la exactitud para la cuantificación de un analito disminuye. La principal consecuencia reside en la dificultad para poder calcular el área bajo la curva del pico debido a que el programa de integración no es capaz de distinguir dónde y cuándo termina la señal. Se recomienda tener un valor de $T < 2$.



El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna. Los factores que pueden afectar el número de platos teóricos incluyen el tamaño de partícula, el flujo de la fase móvil, la temperatura de la columna, la viscosidad de la fase móvil y el peso molecular del analito. Se recomienda un valor de $N > 2000$ [60].

La resolución (R) es una medida relacionada con el grado de separación entre dos picos cromatográficos adyacentes. Es una función de la eficiencia de la columna y se calcula para asegurar que los compuestos que eluyen cerca, se resuelvan unos de otros. Es deseable una resolución mayor a 2 entre el pico de interés y la señal más cercana.

Como se mencionó anteriormente, este parámetro de calidad del método se evaluó mediante el análisis de cinco inyecciones de una solución de metformina o famotidina a una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos para la metformina y famotidina se muestran en las **Tablas 5.9 y 5.10**, respectivamente. Los resultados obtenidos en cada una de las determinaciones para ambos marcadores, se encuentran dentro de los criterios de aceptación. Aún más, el coeficiente de variación entre las réplicas es menor al 2%, por lo tanto, el sistema cromatográfico es adecuado para la ejecución de los análisis.



Tabla 5.9 Adecuabilidad del sistema para analizar metformina

	Fase Móvil	HBSS	Criterios de aceptación
Factor de coleo	1.84	1.36	$T < 2$
Resolución	12	12	$R > 2$
K'	2	2	$K' > 2$
No. de platos teóricos	3099	5026	$N > 2000$
Inyección	Área		
1	1099149	1092497	
2	1099166	1092512	
3	1098607	1094242	
4	1098519	1093613	
5	1098555	1094255	
Promedio	1098799	1093424	
DE	328.6293	878.4189	
%CV	0.03	0.08	

Tabla 5.10 Adecuabilidad del sistema para analizar famotidina

	Fase Móvil	HBSS	Criterios de aceptación
Factor de coleo	1.15	1.18	$T < 2$
Resolución	11.17	11.59	$R > 2$
K'	2	2	$K' > 2$
No. de platos teóricos	2913	3157	$N > 2000$
Inyección	Área		
1	109263	87438	
2	109360	87915	
3	107355	88364	
4	109379	88478	
5	108673	87805	
Promedio	108806	88000	
DE	861.2758	424.8747	
%CV	0.79	0.48	



5.1.2.2 Precisión del sistema

La precisión del sistema se refiere a la variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica, la cual puede ser originada por el analista, equipo e instrumentos de medición; en general, es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica [59].

Este parámetro de calidad del método se evaluó a través del coeficiente de variación de la respuesta analítica de 6 réplicas, en tres niveles de concentración. Para la metformina fueron: 45, 105 y 130 μM , mientras que, para la famotidina fueron: 15, 40 y 70 μM utilizando como diluyente la fase móvil. En las **Tablas 5.11 y 5.12** se resumen los valores de la respuesta analítica obtenida, para cada nivel de concentración, en ambos fármacos. El coeficiente de variación obtenido en los tres niveles de concentración tanto para la metformina como para la famotidina es menor al 2%, por lo tanto, se concluye que el sistema es preciso.

Tabla 5.11 Precisión del sistema para la cuantificación de metformina

No. De muestra	Área (mUA)		
	Nivel Bajo 45 μM	Nivel Medio 105 μM	Nivel Alto 130 μM
1	915193	2149279	2637932
2	911980	2140318	2636761
3	904762	2149863	2660244
4	926798	2131270	2642028
5	910948	2131960	2637894
6	901807	2128041	2639495
Promedio	911914.7	2138455.2	2642392.3
DE	8792.3	9518.7	8933.7
% CV	0.96	0.45	0.34



Tabla 5.12 Precisión del sistema para la cuantificación de famotidina

No. De muestra	Área (mUA)		
	Nivel Bajo 15 µM	Nivel Medio 40 µM	Nivel Alto 70 µM
1	48445	128101	224229
2	49043	127979	224333
3	48275	128093	224587
4	48300	127725	223867
5	47647	128042	224091
6	48905	127584	225170
Promedio	48435.8	127920.7	224379.5
DE	501.1	215.4	455.8
% CV	1.03	0.17	0.20

5.1.2.3 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan, a un modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica [59].

La linealidad del sistema se evaluó mediante el análisis de tres curvas patrón con diez niveles de concentración para la metformina y siete niveles para la famotidina. El ajuste de la respuesta obtenida, en función de la concentración, se llevó a cabo por medio de una regresión lineal simple mediante el uso del software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

5.1.2.3.1 Linealidad del sistema de la metformina

Los datos obtenidos para la linealidad del sistema de la metformina permitieron estimar el siguiente modelo lineal ajustado:

$$\text{Área (mUA)}: - 10762.4 + 20569.5 * \text{Concentración } (\mu\text{M})$$

El valor de la pendiente y de la ordenada al origen se estimó por medio del método de mínimos cuadrados. Desde el punto de vista estadístico, la pendiente ($\beta_1 = 20569.5$) es el cambio de la media de la distribución del área bajo la curva



producido por un cambio unitario en la concentración, mientras que, la ordenada al origen ($\beta_0 = -10762.4$), es la media de la distribución de la respuesta del área bajo la curva cuando la muestra se encuentra sin analito [61].

Para evaluar el modelo de regresión además de estimar la pendiente y la ordenada al origen es necesario probar hipótesis y establecer los intervalos de confianza de los parámetros del modelo; las hipótesis se relacionan con la significancia de la regresión y deben establecerse tanto para la ordenada al origen como para la pendiente. De manera general, las hipótesis que se plantearon son:

Prueba de la β_1

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Prueba de la β_0

$$H_0: \beta_0 = 0$$

$$H_1: \beta_0 \neq 0$$

Para poder probar dichas hipótesis se empleó una prueba t así como el método del valor P . Los valores estimados se resumen en la **Tabla 5.13** para cada uno de los coeficientes de regresión.

En el caso del estadístico t , la hipótesis nula se rechaza si $|t_0| > t_{\alpha/2, (n-2)}$. Con un valor de confianza del 95%, $\alpha/2$ tiene un valor de 0.025, mientras que, los grados de libertad se refieren al número de observaciones menos 2 (en este caso fueron 30 observaciones), es decir, para este análisis se emplearon 28 grados de libertad y un valor de $t_{\alpha/2, (n-2)}$ de 2.048 [61].

Con base en lo antes expuesto, el valor de la prueba t para la pendiente ($t = 287.074$) es mayor que su correspondiente valor crítico ($t_{0.025, 28} = 2.048$), es decir, la hipótesis nula se rechaza; por lo tanto, se deduce que existe una relación lineal entre la respuesta y la concentración. Por otra parte, para la ordenada al



origen, el valor de la prueba t ($t= |1.73354|$) es menor a su valor crítico ($t_{0.025, 28}= 2.048$), por lo tanto, la hipótesis nula no se rechaza, y se deduce que, la ordenada al origen pasa por cero.

Con respecto al método del valor P, es importante mencionar que se rechaza la hipótesis nula si el valor P asociado es igual o menor que el nivel de significancia (α) establecido (en este caso $\alpha=0.05$). Como se observa en la **Tabla 5.13**, el valor P de la pendiente, es mucho menor que el valor de α ; por lo tanto, se confirma el rechazo de la hipótesis nula. En contraste, el valor P de la ordenada al origen es mayor que el valor α , por ende, la hipótesis nula no puede rechazarse.

Tabla 5.13 Análisis de la regresión del modelo de linealidad del sistema de la metformina

Parámetro	Mínimos cuadrados		Prueba t	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor-P	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-10762.4	6208.34	-1.73354	0.09399974	-23479.62195	1954.782694
Pendiente de la recta (β_1)	20569.5	71.6522	287.074	4.0631-50	20422.73374	20716.27938

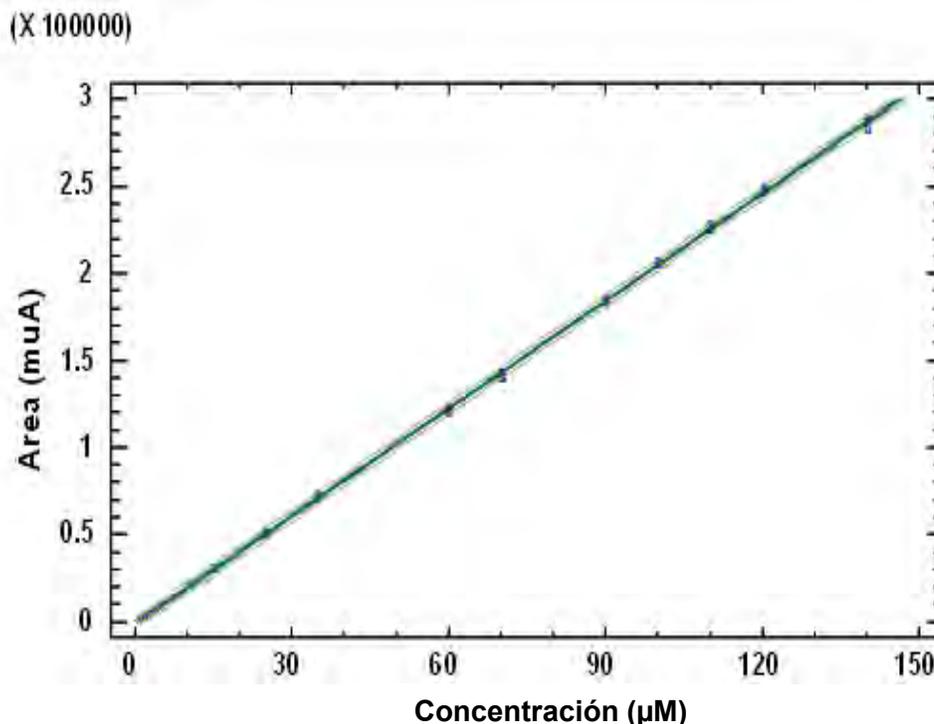
Con relación a los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión cabe destacar que en el caso de la ordenada al origen el intervalo incluye el cero y el valor de su coeficiente, mientras que, el intervalo de confianza para la pendiente incluye el valor del coeficiente y no incluye el cero [61].

Estos resultados confirman también las pruebas de significancia de la regresión.

La **Gráfica 5.3** ilustra el comportamiento entre la concentración y la respuesta analítica. Sin embargo, se deben considerar otros análisis estadísticos para determinar si el modelo es útil como predictor (comprobar la adecuabilidad del modelo).



Gráfica 5.3 Linealidad del sistema



De acuerdo con lo descrito por D. Montgomery, los residuales, tienen un papel importante en la investigación de la adecuabilidad del modelo de regresión ajustado, y en la identificación de las diferencias con respecto a las hipótesis básicas (como la varianza constante y la de errores no correlacionados). Por este motivo, se calcularon los valores residuales a partir de los coeficientes de la regresión [61].

Los residuales (e_i) se definen como, la desviación de los valores observados en la respuesta y el valor ajustado correspondiente y_i (valor estimado, originado por el modelo ajustado). Entre las propiedades más importantes de los residuales destacan: la suma de los residuales ($\sum e_i$) en cualquier modelo de regresión que contenga una β_0 , siempre es igual a cero y, la suma de los valores observados ($\sum y_i$) es igual a la suma de los valores ajustados ($\sum \hat{y}_i$) [61].

Como se observa en la **Tabla 5.14**, el valor de $\sum e_i$ se aproxima a cero, mientras que $\sum y_i$ es igual a $\sum \hat{y}_i$.



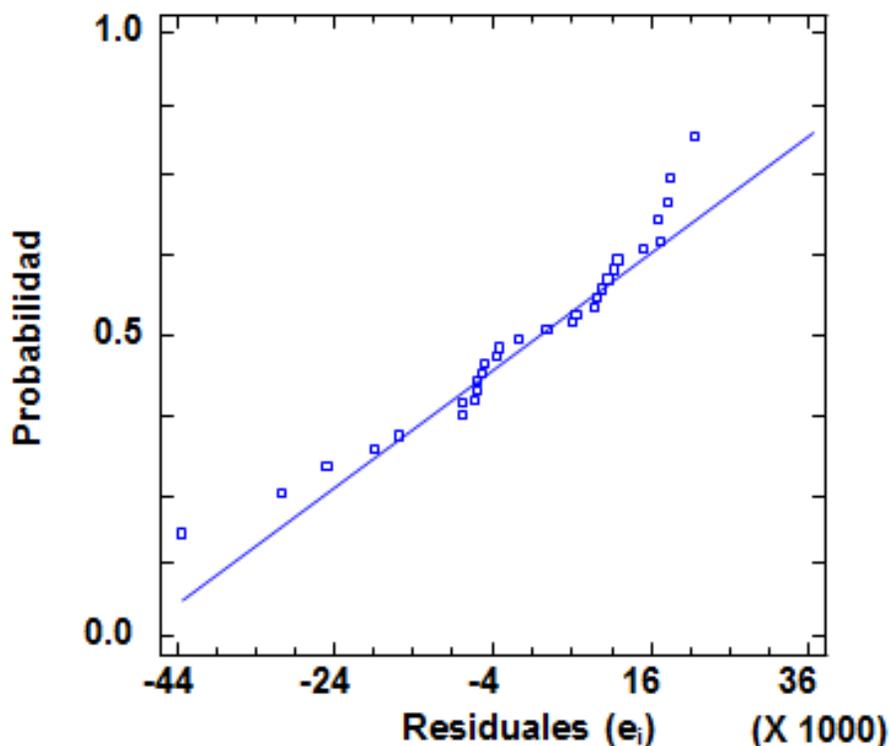
Tabla 5.14 Valores ajustados y residuales para las observaciones de la linealidad del sistema

Observación	Valor observado (y_i)	Valor ajustado (\hat{y}_i)	Residuos (e_i)	Residuos estandarizados (d_i)
1	304547	298397.264	6149.736041	0.394783193
2	500779	504503.7197	-3724.719684	-0.239108918
3	704010	710610.1754	-6600.175409	-0.423699213
4	1206666	1225876.315	-19210.31472	-1.233208928
5	1426102	1431982.77	-5880.770446	-0.377516908
6	1843451	1844195.682	-744.6818951	-0.047804962
7	2060888	2050302.138	10585.86238	0.679560964
8	2271473	2256408.593	15064.40666	0.967061761
9	2480946	2462515.049	18430.95093	1.183177556
10	2868898	2874727.961	-5829.960519	-0.374255157
11	308154	298397.264	9756.736041	0.626335079
12	501261	504503.7197	-3242.719684	-0.208166858
13	727640	710610.1754	17029.82459	1.093232049
14	1219046	1225876.315	-6830.314721	-0.43847304
15	1406933	1431982.77	-25049.77045	-1.608073631
16	1838957	1844195.682	-5238.681895	-0.336297941
17	2059202	2050302.138	8899.86238	0.571327951
18	2275044	2256408.593	18635.40666	1.196302621
19	2484173	2462515.049	21657.95093	1.390335287
20	2891182	2874727.961	16454.03948	1.05626944
21	309732	298397.264	11334.73604	0.727635017
22	516239	504503.7197	11735.28032	0.753348014
23	713445	710610.1754	2834.824591	0.181981974
24	1209921	1225876.315	-15955.31472	-1.024253732
25	1401220	1431982.77	-30762.77045	-1.974820491
26	1838848	1844195.682	-5347.681895	-0.343295211
27	2059387	2050302.138	9084.86238	0.583204052
28	2250152	2256408.593	-6256.593345	-0.401642913
29	2469047	2462515.049	6531.950931	0.419319533
30	2831216	2874727.961	-43511.96052	-2.793256589
	$\Sigma y_i = 46978559$	$\Sigma \hat{y}_i = 46978559$	$\Sigma e_i = 1.03028E-08$	$\Sigma d_i = 6.59917E-13$



Por otro lado, el análisis de la gráfica de los residuales es una forma muy eficiente de investigar el ajuste adecuado del modelo de regresión; también, para comprobar las premisas básicas. En este sentido, la **Gráfica 5.4** ilustra el comportamiento de los residuales en una gráfica de probabilidad normal. De manera general, los residuales caen sobre la línea recta indicando un comportamiento de distribución normal. Según Montgomery, los tamaños de muestra pequeños producen con frecuencia gráficas de probabilidad normal que se desvían de la linealidad de manera significativa. Sin embargo, se requieren 20 puntos para producir gráficas de probabilidad suficientemente estables; en este caso particular el número de muestras analizado fue de 60 [61].

Gráfica 5.4 Gráfica de probabilidad normal para la linealidad del sistema

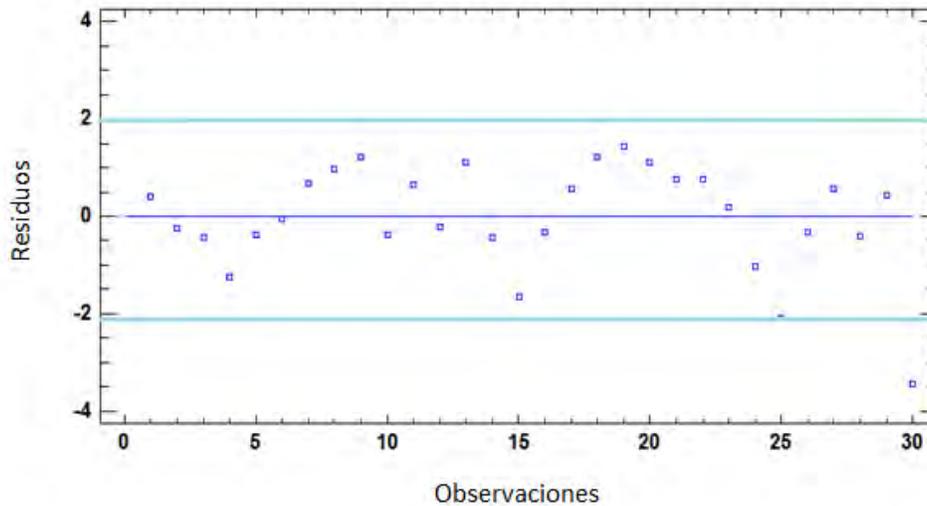


Para completar el análisis del modelo se realizó una gráfica de distribución de los residuales para cada observación. Esta gráfica mide el número de desviaciones estándar que “se desvía” cada valor observado de la variable Y en el modelo



ajustado. Como se observa en la **Gráfica 5.5**, los residuales se circunscriben en una banda horizontal estrecha indicando que no existen defectos en el modelo.

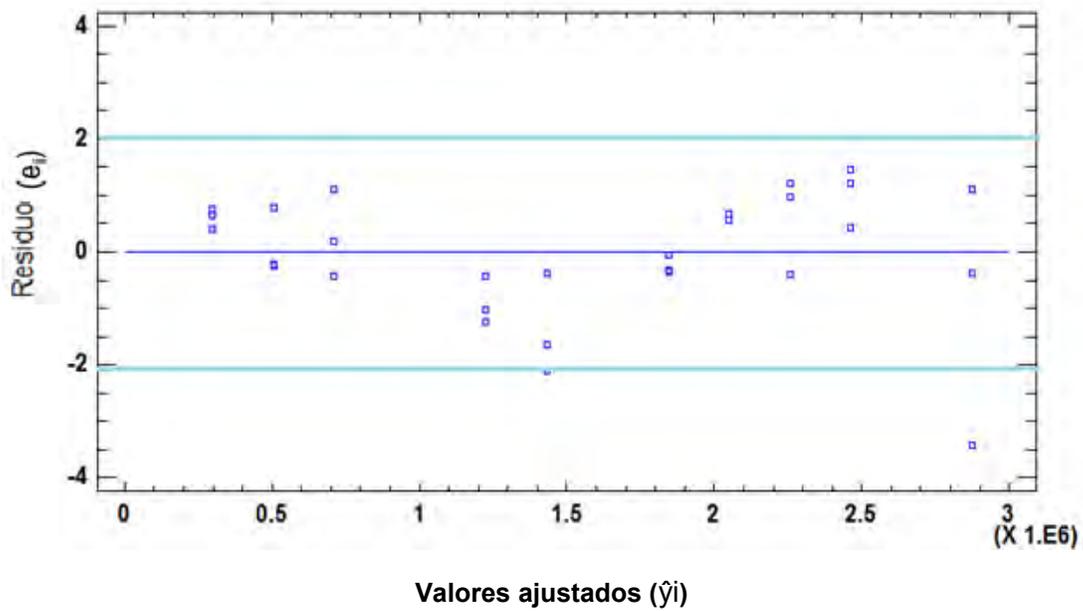
Gráfica 5.5 Gráfica de los residuos en función de las observaciones



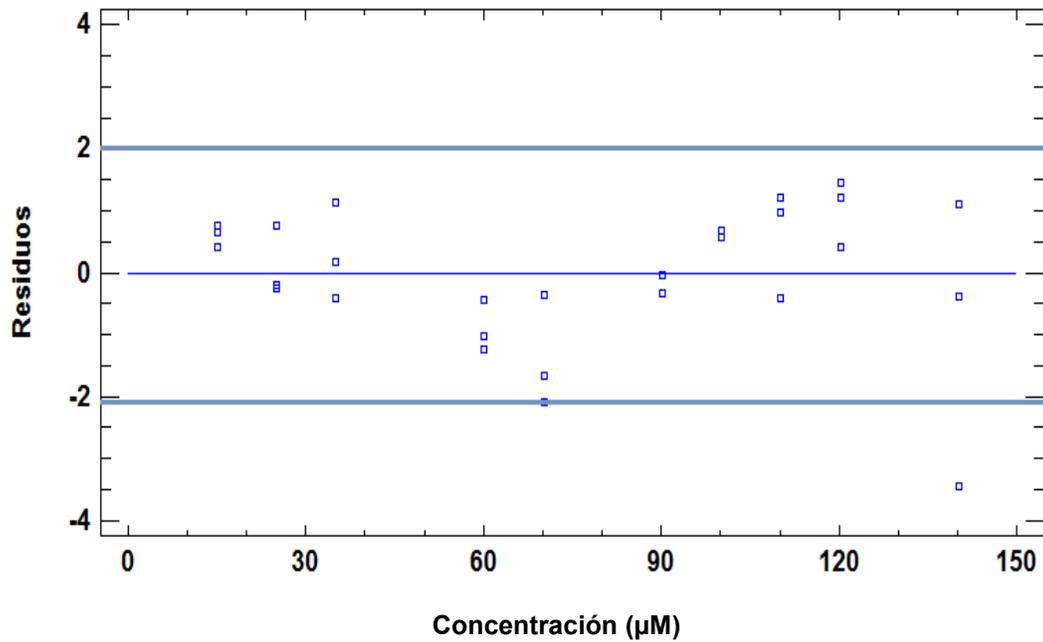
Normalmente, se deben graficar los residuales en función de los valores ajustados y no con los valores observados debido a que los residuales y los valores ajustados no están correlacionados, mientras que, los residuos y los valores observados están correlacionados (**Gráfica 5.5**). Considerando lo antes expuesto, la **Gráfica 5.6** ilustra los residuos en función de los valores ajustados y la **Gráfica 5.7** ilustra los residuales en función del regresor; en ambos casos se observa que los residuales se pueden confinar en una banda horizontal.



Gráfica 5.6 Gráfica de los residuos en función de los valores ajustados



Gráfica 5.7 Gráfica de los residuos en función del regresor





Para probar el significado de la regresión también se puede usar el análisis de la varianza [61]. Para ello, se plantearon las siguientes hipótesis para la ordenada al origen y la pendiente:

H_0 : el modelo estadístico no describe una relación lineal

H_1 : el modelo estadístico describe una relación lineal

En la prueba de hipótesis se utilizó la prueba F. La hipótesis nula ($H_0: \beta_1 = 0$) se rechaza si: $F_0 > F_{\alpha,1,n-2}$. En este caso, la significancia de la prueba se estableció con un valor de 0.05 (α) y un tamaño de muestra con 30 observaciones. Como se observa en la **Tabla 5.15** el valor obtenido para F_0 es mayor al valor crítico, por lo tanto, es posible concluir que el modelo describe una relación lineal. Aún más, el valor P para este análisis (menor a 0.05) apoya la conclusión realizada en el sentido de que existe una relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración con un nivel de confianza del 95%.

Finalmente, se realizó un análisis estadístico de la regresión. En la **Tabla 5.16** se resumen los valores de los parámetros calculados que describen el modelo. El coeficiente de determinación (r^2) indica que el modelo ajustado explica el 99.96 % de la variabilidad en el área (es la proporción de la variación explicada por el regresor x), mientras que, el valor del coeficiente de correlación (0.9998) indica una relación fuerte entre las variables.

Tabla 5.15 Análisis de varianza de la regresión lineal con carencia de ajuste

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón- F_0	Valor- P	F crítica
Modelo	2.07121×10^{13}	1	2.07121×10^{13}	82411.73	<0.05	4.20
Residuo	7.0371×10^9	28	2.51325×10^8			
Total (Corr.)	2.07192×10^{13}	29				



Tabla 5.16 Datos estadísticos de la regresión lineal del sistema

Parámetro	Valor
Ordenada al origen	-10762.4
Pendiente de la línea recta	20569.5
Coefficiente de correlación (r)	0.99983
Coefficiente de determinación (R ²)	0.99966
Coefficiente de variación de la regresión	0.58%

5.1.2.3.2 Linealidad del sistema de la famotidina

El mismo procedimiento descrito en el numeral 5.1.2.3.1 se realizó para calcular el siguiente modelo lineal para la famotidina:

$$\text{Área (mUA)}: - 489.3 + 3210.35 * \text{Concentración (}\mu\text{M)}$$

En la **Tabla 5.17** se resume el análisis de la regresión del modelo de linealidad del sistema y en la **Tabla 5.18** se muestran los valores ajustados y residuales para las observaciones de la linealidad del sistema.

Tabla 5.17 Análisis de la regresión del modelo de linealidad del sistema

Parámetro	Mínimos cuadrados		Prueba t	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor-P	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β ₀)	-489.3	593.6886526	-0.824168863	0.42006989	-1731.904333	753.3049288
Pendiente de la recta (β ₁)	3210.35	12.54093837	255.9894747	4.4427E-35	3184.099741	3236.596712



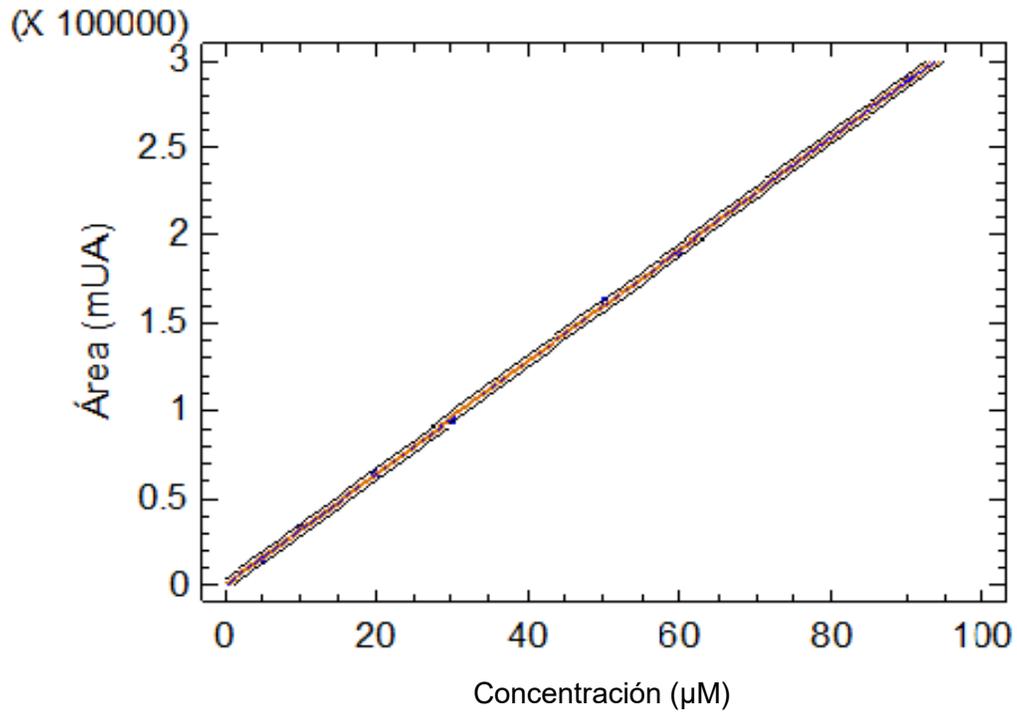
Tabla 5.18 Valores ajustados y residuales para las observaciones de la linealidad del sistema

Observación	Valor observado (y _i)	Valor ajustado (ŷ _i)	Residuos (e _i)	Residuos estandarizados (d _i)
1	14876	15594.54491	-718.5449127	-0.452915173
2	33396	31678.38953	1717.610473	1.08264888
3	63736	63846.07876	-110.0787569	-0.06938514
4	94601	96013.76799	-1412.767986	-0.89049974
5	162401	160349.1464	2051.853555	1.293329884
6	190245	192516.8357	-2271.835675	-1.431989609
7	289511	289019.9034	491.0966369	0.309549361
8	14956	15594.54491	-638.5449127	-0.402489357
9	33179	31678.38953	1500.610473	0.945868853
10	64580	63846.07876	733.9212431	0.462607224
11	94384	96013.76799	-1629.767986	-1.027279767
12	162326	160349.1464	1976.853555	1.246055681
13	190336	192516.8357	-2180.835675	-1.374630243
14	289390	289019.9034	370.0966369	0.233280313
15	14758	15594.54491	-836.5449127	-0.527293253
16	33029	31678.38953	1350.610473	0.851320447
17	64697	63846.07876	850.9212431	0.53635498
18	93348	96013.76799	-2665.767986	-1.68029409
19	162633	160349.1464	2283.853555	1.439564752
20	190,560	192516.8357	-1956.835675	-1.233437957
21	290114	289019.9034	1094.096637	0.689633952
	$\Sigma y_i = 2547056$	$\Sigma \hat{y}_i = 2547056$	$\Sigma e_i = -1.09139E-10$	$\Sigma d_i = -6.88338E-14$

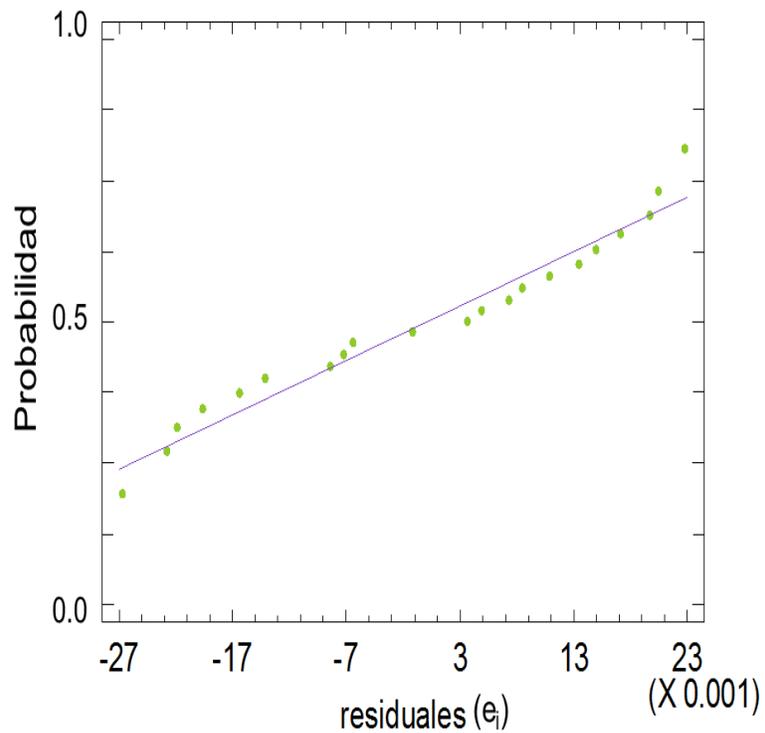
La **Gráfica 5.8** ilustra el comportamiento observado al relacionar la concentración y la respuesta analítica, mientras que, la **Gráfica 5.9** muestra el comportamiento de los residuales en una gráfica de probabilidad normal. De manera general, los residuales caen sobre la línea recta indicando un comportamiento de distribución normal.



Gráfica 5.8 Linealidad del sistema para cuantificar famotidina



Gráfica 5.9 Gráfica de la probabilidad normal para la linealidad del sistema



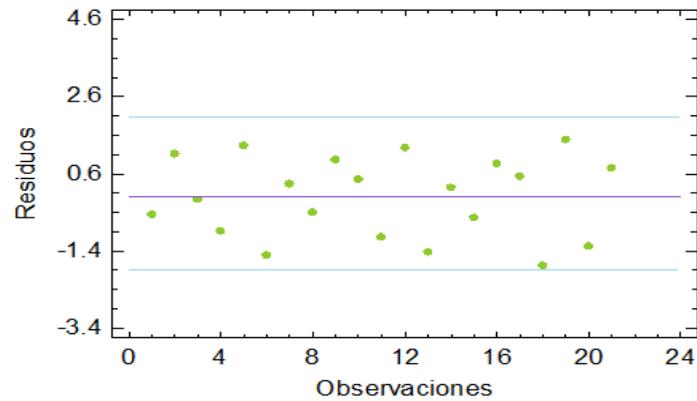


Asimismo, la **Tabla 5.19** muestra la gráfica de los residuos en función de las observaciones, la gráfica de los residuos en función de los valores ajustados y la gráfica de los residuos en función del regresor. Como se puede observar, la gráfica de los residuos en función de los valores ajustados y la gráfica de los residuos en función del regresor presentan una distribución de doble arco, este tipo de distribución indica que la varianza de los errores no es constante. El método más común para mejorar la varianza en los errores consiste en aplicar una transformación adecuada a la variable regresora o a la respuesta o bien, usar el método de mínimos cuadrados ponderados.

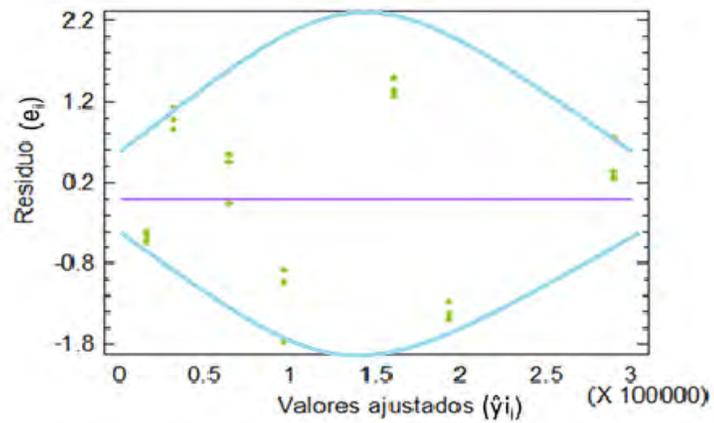
Finalmente, la **Tabla 5.20** muestra el análisis de varianza con carencia de ajuste y en la **Tabla 5.21** se resumen los valores de los parámetros calculados que describen el modelo. Los resultados obtenidos indican que más del 99% de la variabilidad obtenida en la respuesta está explicada por el modelo de linealidad ajustado, concluyendo así que, con un nivel de confianza del 95%, existe una relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración.

Tabla 5.19 (a) Gráfica de los residuos en función de las observaciones, (b) Gráfica de los residuos en función de los valores ajustados, (c) Gráfica de los residuos en función del regresor.

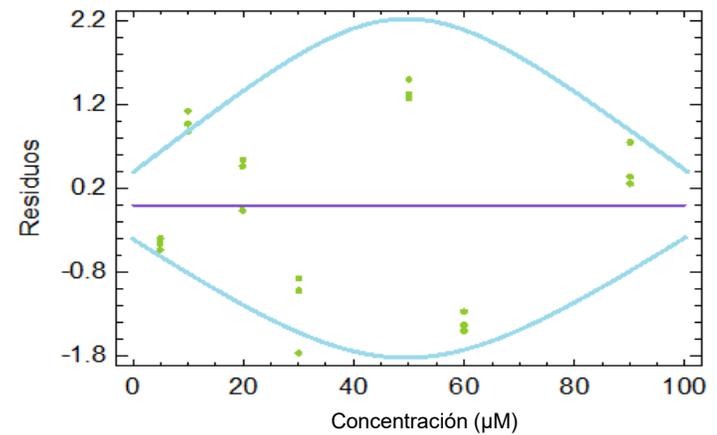
(a)



(b)



(c)



**Tabla 5.20** Análisis de varianza de la regresión lineal con carencia de ajuste

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón- F_0	Valor-P	F crítica
Modelo	1.73618×10^{11}	1	1.73618×10^{11}	65530.61	<0.05	4.38
Residuo	5.03389×10^7	19	2.64942×10^6			
Total (Corr.)	1.73668×10^{11}	20				

Tabla 5.21 Datos estadísticos de la regresión lineal del sistema

Parámetro	Valor
Ordenada al origen	-489.3
Pendiente de la línea recta	3210.35
Coefficiente de correlación (r)	0.999855
Coefficiente de determinación (R^2)	0.99971
Coefficiente de variación de la regresión	0.44%

5.1.3 Validación de los métodos bioanalíticos

Una vez concluida la validación del sistema se realizó la validación de los métodos bioanalíticos de acuerdo con los criterios establecidos en la Guía de validación de métodos bioanalíticos “*Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*” emitida por la FDA. De manera general, esta guía se emplea para procedimientos bioanalíticos donde se aplique, entre otras técnicas, la cromatografía para determinar cuantitativamente los fármacos y/o metabolitos en matrices biológicas [30]. Los parámetros que conformaron la validación fueron los siguientes: linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, límite de cuantificación, recobro y estabilidad.

A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros de desempeño evaluados.



5.1.3.1 Linealidad del método

La linealidad del método se determinó por medio del análisis de seis curvas de calibración, preparadas en diferentes días. El ajuste de la respuesta obtenida para la famotidina y la metformina, en función de su concentración, se llevó a cabo por medio de una regresión lineal simple mediante el uso del software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

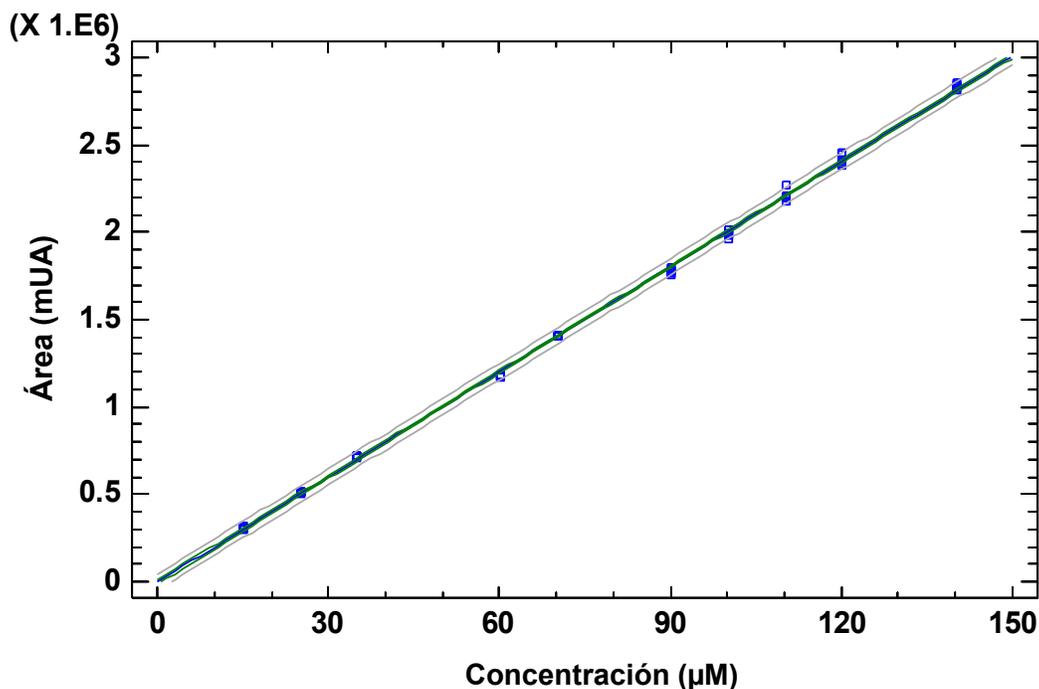
5.1.3.1.1 Linealidad del método para cuantificar metformina

Los datos obtenidos para la linealidad del método permitieron estimar el siguiente modelo lineal ajustado:

$$\text{Área (mUA)}: -732.88 + 20044.2 * \text{Concentración } (\mu\text{M})$$

En la **Gráfica 5.10** se ilustra la relación existente entre el área y la concentración. Como se observa, la respuesta obtenida es directamente proporcional a la concentración.

Gráfica 5.10 Linealidad del método para cuantificar metformina





En la **Tabla 5.22** se muestran los valores estimados para la prueba t y el valor P para cada uno de los coeficientes de regresión. En el caso del estadístico t para la pendiente si $|t_0| > t_{\alpha/2,(n-2)}$ existe una relación lineal entre la respuesta y la concentración, mientras que, para la ordenada al origen sí $|t_0| < t_{\alpha/2,(n-2)}$ la ordenada al origen pasa por cero. Con base en lo antes expuesto el valor de la prueba t para la pendiente ($t=274.111$) es mayor a su valor crítico ($t_{0.025, 58}= 2.000$), asimismo, el valor de la prueba t para la ordenada al origen ($t=-0.115671$) es menor a su valor crítico ($t_{0.025,58}= 2.000$). En el caso del valor P para ambos coeficientes de regresión, podemos observar (**Tabla 5.22**) que el valor estimado para la ordenada al origen es mayor que el nivel de significancia ($\alpha=0.05$), mientras que, el valor estimado para la pendiente es menor a 0.05 .

En el caso del análisis de varianza, los valores estimados se resumen en la **Tabla 5.23**, en la cual, podemos observar que el valor de F_0 es mayor al valor crítico, por lo tanto, existe una relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración.

Con base a lo antes expuesto, podemos concluir, con un nivel de confianza del 95%, que existe una relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración. Finalmente, en la **Tabla 5.24** se resumen los valores de los parámetros calculados que describen el modelo.

Tabla 5.22 Análisis de la regresión para establecer el modelo de linealidad del método

Parámetro	Mínimos cuadrados		Prueba t	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor-P	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-732.88	6335.9	-0.115671	0.9083	-13415.56	11949.80
Pendiente de la recta (β_1)	20044.2	73.1244	274.111	5.6039×10^{-92}	19897.82	20190.57

**Tabla 5.23** Análisis de varianza de la regresión lineal con carencia de ajuste

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F ₀	Valor-P	F crítica
Modelo	3.93354 x10 ¹³	1	3.93354 x10 ¹³	75136.76	<0.05	4.000
Residuo	3.0364x10 ¹⁰	58	5.23518x10 ⁸			
Total (Corr.)	3.93658x10 ¹³	59				

Tabla 5.24 Datos estadísticos de la regresión lineal del método

Parámetro	Valor
Ordenada al origen	-732.88
Pendiente de la línea recta	20044.2
Coefficiente de correlación (r)	0.999614
Coefficiente de determinación (R ²)	0.999229
Coefficiente de variación de la regresión	0.82%

5.1.3.1.2 Linealidad del método para cuantificar famotidina

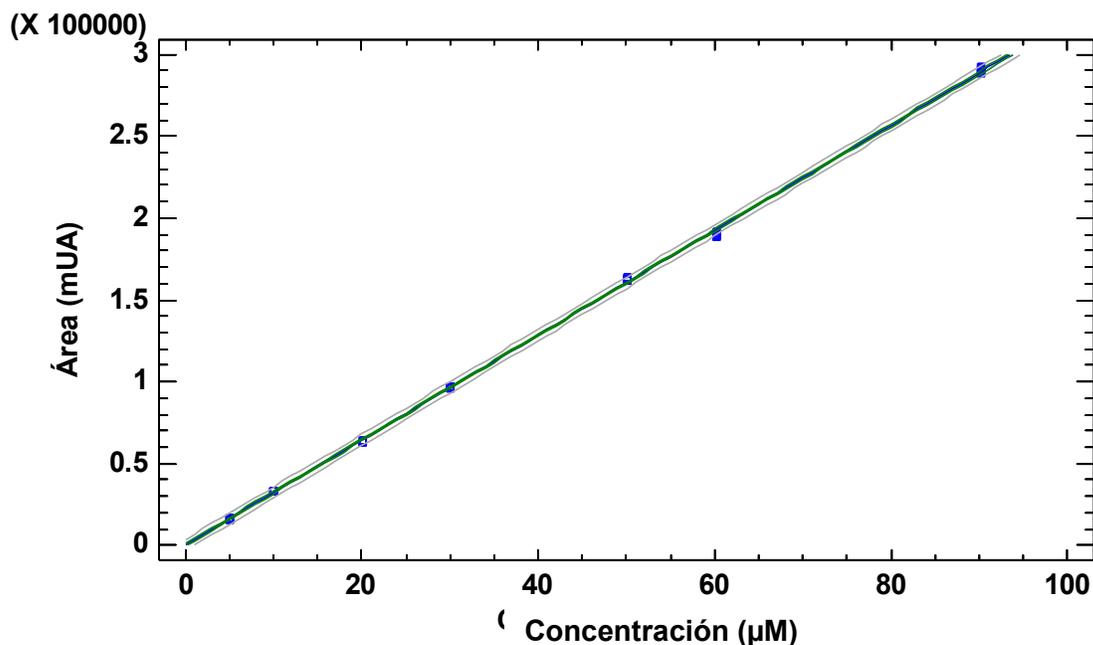
Los datos obtenidos para la linealidad del método permitieron estimar el siguiente modelo lineal ajustado:

$$\text{Área (mUA)}: 282.692 + 3205.13 * \text{Concentración } (\mu\text{M})$$

En la **Gráfica 5.11** se ilustra la relación existente entre el área y la concentración. Como se observa, la respuesta obtenida es directamente proporcional a la concentración.



Gráfica 5.11 Linealidad del método para cuantificar famotidina



Por otro lado, en la **Tabla 5.25** se observan los valores estimados para la prueba t y el valor P para cada uno de los coeficientes de regresión. En el caso del estadístico t para la pendiente ($t=351.507$) su valor es mayor a su valor crítico ($t_{0.025, 40}= 2.021$); en contraste, el valor de la prueba t para la ordenada al origen ($t=0.654897$) es menor a su valor crítico ($t_{0.025,40}= 2.021$). Asimismo, se puede observar que el valor P estimado para la ordenada al origen es mayor que el nivel de significancia ($\alpha=0.05$), mientras que, el valor estimado para la pendiente es menor a 0.05.

En cuanto al análisis de varianza, los valores estimados se resumen en la **Tabla 5.26**, en la cual, se puede observar que el valor de F_0 es mayor al valor crítico, por lo tanto, existe una relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración.

Estos hallazgos permiten concluir, con un nivel de confianza del 95%, que existe una relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración.



Finalmente, en la **Tabla 5.27** se resumen los valores de los parámetros calculados que describen el modelo. El modelo ajustado explica el 99.96% de la variabilidad en el área.

Tabla 5.25 Análisis de la regresión para establecer el modelo de linealidad del método

Parámetro	Mínimos cuadrados		Prueba t	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor-P	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	282.692	431.659	0.654897	0.5153	-589.7235	1155.10774
Pendiente de la recta (β_1)	3205.13	9.11827	351.507	1.9921×10^{-71}	3186.7012	3223.55865

Tabla 5.26 Análisis de varianza de la regresión lineal con carencia de ajuste

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón- F_0	Valor-P	F crítica
Modelo	3.46108×10^{11}	1	3.46108×10^{11}	123556.86	<0.05	4.08
Residuo	1.12048×10^8	40	2.8012×10^6			
Total (Corr.)	3.4622×10^{11}	41				

Tabla 5.27 Datos estadísticos de la regresión lineal del método

Parámetro	Valor
Ordenada al origen	282.692
Pendiente de la línea recta	3205.13
Coefficiente de correlación (r)	0.999838
Coefficiente de determinación (R^2)	0.999676
Coefficiente de variación de la regresión	0.49%



5.1.3.2 Precisión y exactitud

Cuando un método es lineal, la variabilidad de un resultado analítico se debe a factores aleatorios, como la incertidumbre de las mediciones debidas a: la balanza analítica, el material graduado, el material volumétrico, los instrumentos de medición de la respuesta analítica, las corridas analíticas y los analistas, por mencionar solo algunos. Estos factores se pueden clasificar en factores aleatorios intramétodo, intralaboratorio e interlaboratorio [59].

La precisión es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos cuando el procedimiento es aplicado repetidamente. En este caso, la precisión del método fue evaluada mediante la repetibilidad y la reproducibilidad (**FDA**) o precisión intermedia (**ICH**) [22,33]. En el primer caso se evaluó la variación de la respuesta analítica, el mismo día, empleando 3 niveles de concentración (nivel bajo, medio y alto); mientras que, en la precisión intermedia, se evaluó la variación de la respuesta en días y analistas diferentes. En las **Tablas 5.28 y 5.29** se resumen los valores obtenidos para evaluar la repetibilidad y en las **Tablas 5.30 y 5.31** se muestran los valores obtenidos para establecer la precisión intermedia del método. En todos los casos se puede observar que, el coeficiente de variación obtenido fue menor al 2%, es decir, la variación obtenida se encuentra dentro del límite establecido tanto en la guía de validación como la NOM-177 (el coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%).

Por otra parte, la exactitud del método debe determinarse en todas las metodologías de carácter cuantitativo [59], ya que, se relaciona con el concepto de sesgo en las mediciones. La definición de este parámetro de calidad establece que es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra [33]. En las **Tablas 5.28 y 5.29** se resumen los valores obtenidos para evaluar la exactitud de los diferentes métodos. Ésta característica de calidad se determinó por medio del cálculo de la diferencia entre el valor nominal de las concentraciones evaluadas y las recuperadas. Como se deduce de la información presentada, para cada uno de los niveles de concentración, la diferencia absoluta con respecto al valor nominal



es menor al 2%. Por lo tanto, el método desarrollado cumple con la especificación establecida tanto en la guía de validación como en la NOM-177 (el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración). De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que los métodos propuestos son exactos y precisos para cuantificar metformina o famotidina, respectivamente.

Tabla 5.28 Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y exactitud del método para cuantificar metformina

No. De muestra	Concentración Recuperada (μM)		
	Nivel de concentración		
	Bajo ($45 \mu\text{M}$)	Medio ($105 \mu\text{M}$)	Alto ($130 \mu\text{M}$)
1	44.63	103.00	127.52
2	44.68	102.79	127.85
3	44.64	102.56	127.46
4	44.65	102.75	128.17
5	44.87	103.97	127.14
Promedio	44.69	103.02	127.63
DE	0.10	0.56	0.40
%CV	0.2	0.5	0.3
Exactitud (%)	99.32	98.11	98.17
Diferencia respecto al valor nominal	0.68	1.89	1.83

Tabla 5.29 Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y exactitud del método para cuantificar famotidina

No. De muestra	Concentración Recuperada (μM)		
	Nivel de concentración		
	Bajo ($15 \mu\text{M}$)	Medio ($40 \mu\text{M}$)	Alto ($70 \mu\text{M}$)
1	14.90	40.57	70.87
2	14.73	40.34	70.84
3	14.74	40.58	71.45
4	14.90	40.27	71.45
5	14.75	40.23	71.34
Promedio	14.80	40.40	71.19
DE	0.09	0.17	0.31
%CV	0.6	0.4	0.4
Exactitud (%)	98.69	101.00	101.70
Diferencia respecto al valor nominal	1.31	1.00	1.70



Tabla 5.30 Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar metformina

Concentración (µM)	Concentración Recuperada (µM)				Promedio	DE	%CV
	Día 1		Día 2				
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2			
45	44.63	44.68	45.74	44.54	44.77	0.38	0.85
	44.68	45.11	45.10	44.28			
	44.64	44.86	45.31	44.42			
	44.65	44.75	44.67	44.16			
	44.87	44.61	45.28	44.40			
105	103.00	104.79	106.17	103.42	104.38	1.28	1.23
	102.79	104.53	105.73	103.66			
	102.56	105.25	106.02	103.40			
	102.75	105.76	105.95	103.17			
	103.97	104.81	106.15	103.78			
130	127.52	129.95	130.19	129.77	129.31	1.11	0.86
	127.85	129.87	130.59	129.46			
	127.46	130.16	130.20	128.98			
	128.17	129.17	130.51	129.78			
	127.14	129.33	130.64	129.52			

Tabla 5.31 Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar famotidina

Concentración (µM)	Concentración Recuperada (µM)				Promedio	DE	%CV
	Día 1		Día 2				
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2			
15	14.93	14.82	14.74	15.01	14.81	0.08	0.52
	14.76	14.84	14.77	14.88			
	14.78	14.80	14.87	14.73			
	14.93	14.85	14.76	14.75			
	14.74	14.77	14.74	14.82			
40	40.64	40.38	40.37	40.41	40.36	0.24	0.61
	40.41	40.46	40.24	39.67			
	40.66	40.67	40.32	40.13			
	40.35	40.75	40.40	40.19			
	40.30	40.11	40.55	40.19			
70	70.99	71.10	71.19	71.25	71.25	0.30	0.42
	70.96	70.30	71.13	71.26			
	71.57	71.31	71.41	71.42			
	71.58	71.13	71.49	71.04			
	71.46	71.56	71.46	71.46			



5.1.3.3 Recobro

Con la finalidad de conocer la relación que existe entre la respuesta obtenida de una muestra procesada (aquella muestra que se extrae o que tiene contacto con la matriz biológica, en este caso, la solución de Hank) a una concentración específica y la respuesta del analito no procesado a la misma concentración (metformina y famotidina en fase móvil) se determinó el recobro absoluto relativo. Como se observa en las **Tablas 5.32 y 5.33**, el porcentaje de recobro absoluto fue mayor al 98.65%, cumpliendo así con lo especificado en la guía de validación de métodos bioanalíticos y en la NOM-177. En estos documentos se establece que el porcentaje de recuperación absoluta no necesariamente debe ser el 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración; por consiguiente, observamos que el coeficiente de variación es menor al 15%, estableciendo que, el recobro es preciso y reproducible.

Tabla 5.32 Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método para cuantificar metformina

Concentración (µM)	\bar{X} Área de metformina en FM	\bar{X} Área de metformina en HBSS	\bar{X} Recobro absoluto
Punto Bajo	885087	881317	99.57
Punto Medio	2140538	2143500	99.86
Punto Alto	2636079	2653716	100.67
		Promedio	100.03
		DE	0.57
		%CV	0.57

Tabla 5.33 Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método para cuantificar famotidina

Concentración (µM)	\bar{X} Área de famotidina en FM	\bar{X} Área de famotidina en HBSS	\bar{X} Recobro absoluto
Punto Bajo	47119	46482	98.65
Punto Medio	128425	128672	100.19
Punto Alto	227654	227890	100.10
		Promedio	99.65
		DE	0.87
		%CV	0.87



5.1.3.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de desempeño analítico que determina la capacidad cuantitativa del método a concentraciones bajas del analito en la muestra [59]. El límite de cuantificación de los diferentes métodos bioanalíticos para determinar metformina y famotidina fue definido como la mínima concentración donde la relación entre la señal analítica y el ruido instrumental fue al menos 5 veces.

En las **Tablas 5.34** y **5.35** se muestran los resultados obtenidos para evaluar este parámetro de calidad. Como se puede apreciar en la **Tabla 5.34**, la precisión y la exactitud para el límite de cuantificación de la metformina presentan valores de 0.37 y 1.96 para el coeficiente de variación y la diferencia absoluta, respectivamente. Asimismo, en la **Tabla 5.35**, la precisión y la exactitud para establecer el límite de cuantificación de la famotidina presentan valores de 1.69 para el coeficiente de variación y 0.59 para la diferencia absoluta. Todos los valores cumplen con los límites establecidos en la Guía de validación y la NOM-177: la diferencia absoluta con respecto al valor nominal y el coeficiente de variación no deben ser mayor al 20%, además, debe de tener una exactitud del $\pm 20\%$.

Finalmente, en las **Figura 5.8** y **5.9** se observa un cromatograma obtenido para el límite de cuantificación de la metformina y la famotidina, respectivamente, empleando el método cromatografico desarrollado.



Tabla 5.34 Resultados obtenidos para evaluar la precisión y la exactitud del límite inferior de cuantificación de la metformina

No. De muestra	Concentración Recuperada (μM)
1	15.39
2	15.27
3	15.27
4	15.26
5	15.28
Promedio	15.29
DE	0.06
%CV	0.37
Exactitud (%)	101.96
Diferencia absoluta respecto al Valor real (%)	1.96

Tabla 5.35 Resultados obtenidos para evaluar la precisión y la exactitud del límite inferior de cuantificación de la famotidina

No. De muestra	Concentración Recuperada (μM)
1	5.09
2	5.09
3	5.10
4	4.92
5	4.96
Promedio	5.03
DE	0.09
%CV	1.69
Exactitud (%)	100.59
Diferencia absoluta respecto al Valor real (%)	0.59

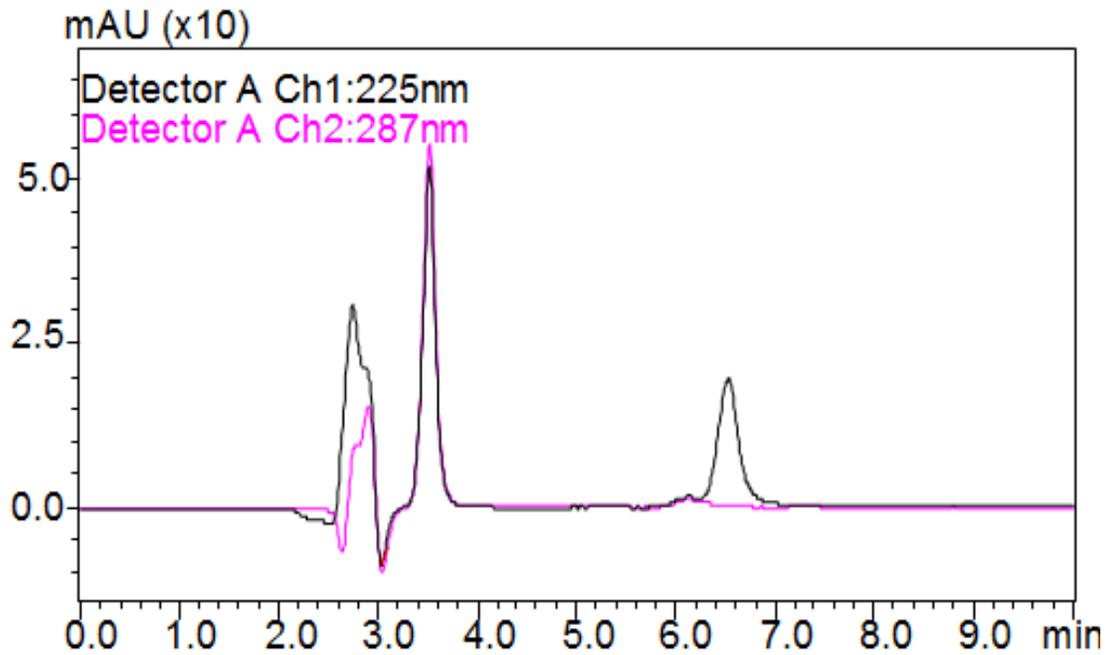


Figura 5.8 Cromatograma obtenido para el límite de cuantificación de la metformina

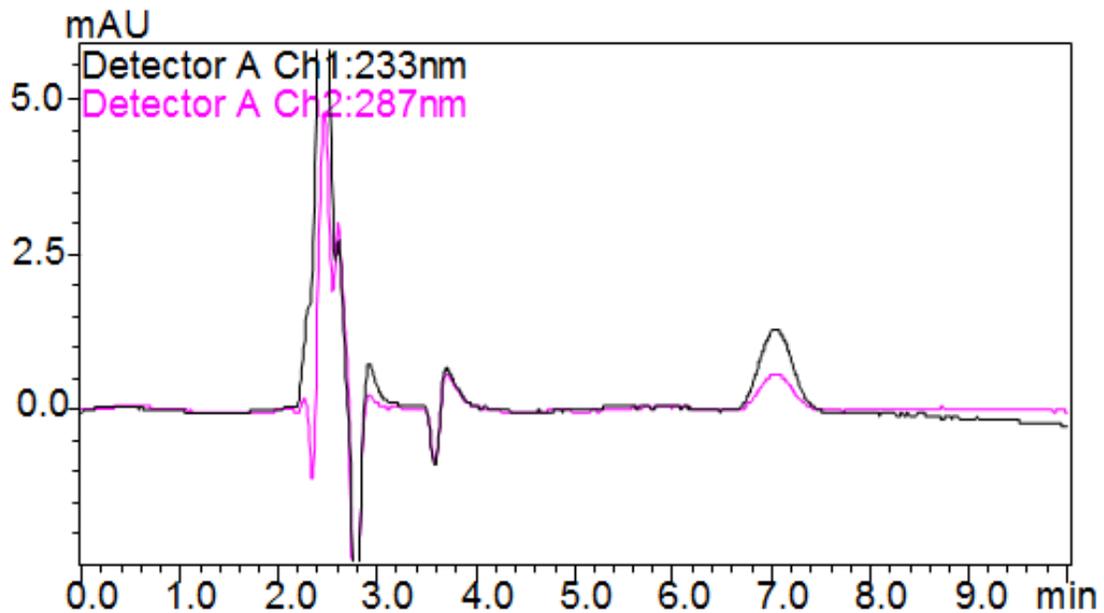


Figura 5.9 Cromatograma obtenido para el límite de cuantificación de la famotidina



5.1.3.5 Estabilidad de la muestra

La estabilidad de un analito en un fluido biológico está en función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del analito y de la matriz biológica.

La importancia de evaluar este parámetro reside en asegurar que el compuesto permanece estable, en la matriz biológica, bajo ciertas condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo) en caso de presentarse contratiempos durante el análisis, es decir, esta evaluación tiene como propósito determinar si las muestras no presentan variación en la concentración.

La estabilidad se evaluó a corto y largo plazo, así como en ciclos de congelación y descongelación. En la **Tabla 5.36** se resumen los datos obtenidos para la estabilidad de la metformina en las diferentes condiciones de almacenamiento. La media de la diferencia absoluta respecto al valor nominal se encuentra entre 0.24% y 4.45%. Asimismo, en la **Tabla 5.37** se muestran los datos obtenidos para la estabilidad de la famotidina en las mismas condiciones de almacenamiento. La media de la diferencia absoluta respecto al valor nominal se encuentra entre 0.16% y 2.79%. De acuerdo con la guía de validación de métodos bioanalíticos y la NOM-177 la muestra es estable cuando la variación obtenida respecto al valor nominal no excede el 15%. Por lo tanto, las muestras de metformina y famotidina en solución de Hank son estables a temperatura ambiente durante 24 h, en ciclos de congelación-descongelación y durante 30 días en congelación.



Tabla 5.36 Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la metformina

	Puntos control					
	Baja (15 µM)		Media (40 µM)		Alta (70 µM)	
	\bar{X} Conc. + DE (µM)	Diferencia respecto al VN (%)	\bar{X} Conc. + DE (µM)	Diferencia respecto al VN (%)	\bar{X} Conc. + DE (µM)	Diferencia respecto al VN (%)
Estabilidad 24 h en el automuestreador	44.87 ± 0.29	0.34	102.82 ± 0.72	3.84	127.73 ± 0.15	3.05
Ciclo 1	44.95 ± 0.32	1.6	104.18 ± 0.34	0.64	130.40 ± 0.13	3.18
Congelación-Descongelación						
Ciclo 2	44.17 ± 0.68	3.31	103.76 ± 0.48	1.04	129.52 ± 0.72	3.92
Congelación-Descongelación						
Ciclo 3	43.78 ± 0.58	4.18	103.74 ± 0.47	1.06	128.82 ± 0.61	4.45
Congelación-Descongelación						
Estabilidad a largo plazo	44.89 ± 0.10	0.24	103.56 ± 0.47	0.42	130.78 ± 0.29	1.21



Tabla 5.37 Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la famotidina

	Puntos control					
	Baja (15 µM)		Media (40 µM)		Alta (70 µM)	
	\bar{X} Conc. + DE (µM)	Diferencia respecto al VN (%)	\bar{X} Conc. + DE (µM)	Diferencia respecto al VN (%)	\bar{X} Conc. + DE (µM)	Diferencia respecto al VN (%)
Estabilidad 24 h en el automuestreador	14.99 ± 0.10	0.82	40.02 ± 0.33	0.33	71.30 ± 0.12	0.64
Ciclo 1 Congelación-Descongelación	14.86 ± 0.10	0.87	40.07 ± 0.14	1.16	71.02 ± 0.17	1.96
Ciclo 2 Congelación-Descongelación	14.70 ± 0.22	1.98	39.90 ± 0.16	1.58	70.83 ± 0.18	2.23
Ciclo 3 Congelación-Descongelación	14.63 ± 0.23	2.43	39.69 ± 0.06	2.11	70.43 ± 0.38	2.79
Estabilidad a largo plazo	14.88 ± 0.19	0.16	40.06 ± 0.53	1.76	70.97 ± 0.56	2.55



6. CONCLUSIONES

- Se desarrollaron y validaron dos métodos bioanalíticos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar metformina y famotidina de acuerdo con los criterios establecidos en la guía de validación de métodos bioanalíticos “*Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*” emitida por la FDA.
- Los parámetros de validación como linealidad, exactitud, precisión, recobro y estabilidad se encuentran dentro de los estándares recomendados por ésta misma guía y cumplen con lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013.
- Los resultados obtenidos representan una importante contribución a los estudios para evaluar el transporte *in vitro* de fármacos modelo en la línea celular Caco-2.



7. PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo los estudios de selectividad para completar la validación del método como lo describe la guía para Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA.
- Aplicar las metodologías desarrolladas para determinar los coeficientes de permeabilidad aparentes de ambos fármacos empleando la línea celular Caco-2.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez Chávez Diana Alejandra (2015), Estudios de permeabilidad de los flavonoides Acacetina y Pinocembrina a través de la monocapa celular Caco-2: un modelo *in vitro* de absorción intestinal, Facultad de Química UNAM, México, D.F. 104 pp.
2. Food and Drug Administration (2000), Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.
3. Thiel-Demby, V. et al (2008), Biopharmaceutics classification system: validation and learnings of an in vitro permeability assay. *Molecular Pharmaceutics*, Vol. 6, No. 1, 11-18.
4. Kratz, J, et al. (2011). An HPLC-UV method for the measurement of permeability of markers drugs in the Caco-2 cell assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 44, 531-537.
5. MJ Gómez-Lechón, M Cascales Angosto (2005), Las ómicas en el desarrollo de nuevos fármacos. Citado el día 14 de enero de 2017.
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/556/574>
6. Magos Guerrero, Gil Alfonso, Lorenzana Jiménez Marte (2009), Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos, *Revista Facultad de Medicina UNAM*, Vol. 52 No. 6 Noviembre-Diciembre, 260-264.
7. Marovac Jacqueline (2001), Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco, *Rev. Méd. Chile* v. 129 No.1 Santiago. Citado el día 14 de enero de 2017
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872001000100015
8. Rendo Pablo (2015), Desarrollo de nuevos medicamentos, de la experiencia clínica al mercado: Una perspectiva desde la industria, *Hematología*, Vol. 19: 177-182.
9. Bayona A, Fajardo N. (2012) Desarrollo de nuevos medicamentos: oportunidades y beneficios para el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 29 (4):521-8



10. Cañas Alonso, Roberto Carlos (2013), Desarrollo y validación de métodos bioanalíticos para cuantificar Casiopeína IIGLY en plasma y sangre de perro Beagle por HPLC-MS y su aplicación en un estudio farmacocinético, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 137 pp.
11. Secretaría de Salud (2005), Hacia una política farmacéutica integral para México, México, D.F. 21-160.
12. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Citado el día 01 de marzo de 2017.
<http://www.cofepris.gob.mx>.
13. Panchagnula, R., Thomas, N. S. (2000), Biopharmaceutics and Pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics*, 201, 131-150.
14. Thiel-Demby, V. *et al.* (2008). Biopharmaceutics classification system: validation and learnings of an *in vitro* permeability assay. *Molecular Pharmaceutics*. 6 (1), 11-18.
15. Hernández Méndez Lourdes Catalina (2015), Estudios de Permeabilidad de 5-O- β -D galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en la línea celular MDCK, Facultad de Química, UNAM, México, D.F, 92 pp.
16. Y. Baena, LF. Ponce D'León (2008), Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo*, Rev. Colomb. Cienc. Químicas. Farm. Vol 37 (1), 18-32.
17. Dahan, A., Miller, J.M. & Amidon, G. (2009) Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World's Top Oral Drugs. *The AAPS Journal* 11(4):740-746.
18. World Health Organization (2006), Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, Who Technical Report Series, fortieth report, Geneva, Annex 7, pp. 358-413.
19. U.S. Department of Health and Human Services (2000) "FDA Guidance for industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics



- Classification System.”, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, U.S.A. Citado el día 10 de marzo de 2017.
<http://www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.htm>
20. Herrera Ruiz, Dea, Hernández Baltazar, Efrén, Espinosa Lara, Julio César, Martínez, Ixchel de la Luz, Ayulia Beltrán, Adela, Martínez Alejo, Manuel (2012), Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos, *Rev. Mex. Cienc. Farm* vol. 43 no. 1 México, 18.-32.
21. Food and Drug Administration (2000), Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.
22. Food and Drug Administration (2015), Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.
23. Shah, P V., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, J I., Skelly P.J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, E. C., Mcdowall, R. D., Pitmann, A. K., Spector, S. (1992). Analytical Method Validation: Bioavailability, Bioequivalence a Pharmacokinetics Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 309-312.
24. Shah, P V. (2007). The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Method Validation, *The AAPS Journal*; 9(1) Article 5, E43-E47.
25. Shah, P V., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, J I., Skelly P.J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, E. C., Mcdowall, R. D., Pitmann, A. K., Spector, S. (1992). Analytical Method Validation: Bioavailability, Bioequivalence a Pharmacokinetics Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(3), 309-312.
26. Shah, P V., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, J I., Skelly P.J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, E. C., Mcdowall, R. D., Pitmann, A. K., Spector, S. (1992). Analytical Method Validation: Bioavailability, Bioequivalence a Pharmacokinetics Studies. *International Journal of Pharmaceutical*, 82 (1-2), 1-7.



27. Shah, P V., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, J I., Skelly P.J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, E. C., Mcdowall, R. D., Pitmann, A. K., Spector, S. (1991). Analytical Method Validation: Bioavailability, Bioequivalence a Pharmacokinetics Studies. Conference report, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetic*, 16(4), 249-255.
28. Text on Validation Of Analytical Procedures Q2A, (1994), International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH).
29. Text on Validation Of Analytical Procedures Q2B, (1996), International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH).
30. Bioanalytical Method Validation (2013). Guidance for Industry, Department of Health and Human Service, Good and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
31. Guideline on Validation of Bioanalytical Methods (2010), European Medicines Agency (EMA).
32. Sonnergaard, J. M. (2006). On the misinterpretation of the correlation coefficient in pharmaceutical sciences. *International Journal of Pharmaceutics*, 321, 12-17.
33. Text on Validation of Analytical Procedures Q2 (R1), (2005), International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH).
34. Causon, Roger, (1997), Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion, *Journal of Chromatography B*, 689, 175-180.
35. Certificate of Analysis (2015), Metformin Hydrochloride. Citado el día 20 de marzo de 2017
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/phr1084?lang=es®ion=MX>



36. Ganga Pharmacy College, Borgaon(K), Makloor, Nizamabad, Pradesch Andhra (2014). Method development of Metformin Hydrochloride RP-HPLC, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Volume 3, Issue 3, 1149-1159.
37. Desai, Divyakant, Wong, Benjamin, Huang, Yande, Ye, Qingmei, Tang, Dan, Guo, Hang, Huang, Ming, Timmins, Peter, (2013), Surfactant-Mediated dissolution of metformin hydrochloride tablets: wetting effects versus ion pairs diffusivity, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103:920-926.
38. Krzysztof Łabuzek, Dariusz Suchy, Bożena Gabryel, Anna Bielecka, Sebastian Liber, Bogusław Okopień (2010). Quantification of metformin by HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacological Reports*, 62, 956-965.
39. Himal Paudel Chhetri, Panna Thapa, Ann Van Schepdael (2014). Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22, 483-487.
40. Drugbank, Metformin. Citado el día 20 de marzo de 2017 <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00331>
41. Open Chemistry Database, PubChem, Metformin. Citado el día 20 de marzo de 2017 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4091#section=Top>
42. Open Chemistry Database, PubChem, Famotidine. Citado el día 22 de marzo de 2017 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/famotidine#section=Molecular-Formula>
43. Remington, Gennaro, Alfonso (2003). Farmacia, 20ª Edición, Tomo 2, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1368 pp.
44. Goodman & Gilman (2006), Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Editorial Mc Graw-Hill/Interamericana de México, 12a. Edición, México. 2044 pp.
45. Drugbank, Famotidine. Citado el día 22 de marzo de 2017 <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00927>



46. U.S. National Library of Medicine, TOXNET, Toxicology data network, HSDB: FAMOTIDINE. Citado el día 23 de marzo de 2017
<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+76824-35-6>
47. M., Saeed, Arayne, Najma Sultana, M. Hashim Zuberi, Farhan Ahmed Siddiqui (2010). Simultaneous Determination of Metformin, Cimetidine, Famotidine, and Ranitidine in Human Serum and Dosage Formulations Using HPLC with UV Detection, *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 48, 721-725.
48. United States Pharmacopeia (2014). USP 37 NF 32.a, <621> Cromatografía, <1226> Validación de Procedimientos.
49. Deepika Thakur, Amandeep Kaur, Suraj Sharma (2016). Application of QbD based approach in method development of RP-HPLC for simultaneous estimation of antidiabetic drugs in pharmaceutical dosage form, *Journal of Pharmaceutical Investigation*.
50. M., Saeed, Arayne, Najma Sultana, M. Hashim Zuberi (2006). Development and validation of RP-HPLC method for the analysis of metformin, Department of Chemistry, University of Karachi, Karachi- Pakistan, Pak, J. Pharm. Sci., Vol. 19 (3), 231-235.
51. Ceren Yardımcı, Nuran Ozaltın, Alper Gurlek, (2007), Simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in plasma by gradient liquid chromatography with UV detection, ScienceDirect, Talanta 72, 1416-1422.
52. Deepali A. Nanaware, Vidhya K. Bhusari, Sunil R. Dhaneshwar (2013). Validated HPLC method for simultaneous quantification of benfotiamine and metformin hydrochloride in bulk drug and formulation, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 5 (2), 138-142.
53. Nashwahgadallah M., (2014), Validated HPLC method for simultaneous determination of sitagliptin, metformine and atorvastatin in pureform and in pharmaceutical formulations, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 6, Issue 5, 665-670.



54. Eva Troja, Leonard Deda, Gëzim Boçari, (2015), Ion-pair HPLC method for the quantification of metformin in human urine, *Journal of Applied Bioanalysis*, Vol. 2 (1), 16-24.
55. G. Satya Sri, S. Ashutosh Kumar, J. Saravanan, Manidipa Debnath, V. Greeshma, N. Sai Krishna (2013), A new RP-HPLC method development for simultaneous estimation of metformin and alogliptin in bulk as well as in pharmaceutical formulation by using PDA detector, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 2 (6), 6720-6743.
56. Srinivas, P., K. Venkataramana, Srinivasa, Rao J, Srinivasa, Rao, N., (2012), Simultaneous determination of metformin and pioglitazone tablets in pharmaceutical dosage form by RP-HPLC method, *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, Vol. 2 (1), 104-109.
57. Gadipally Saikiran, (2014), Method Development of Metformin Hydrochloride RP-HPLC, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 3 (3), 1149-1159.
58. Montgomery, D. (2005), Diseño y análisis de experimentos, 2ª Edición, Editorial Limusa Wiley S.A de C.V., México, pp. 63-80.
59. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2014). Apéndice III. Validación de Métodos Analíticos. Comisión permanente de la Farmacopea. Tomo II. 11ª Edición, Secretaría de Salud, México, pp. 2789- 2800.
60. Skoog, D., James, F., y Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental, 5ª Edición, Editorial Mc Graw Hill, España, pp 730-735, 785-824.
61. Montgomery, Douglas C., Peck, Elizabeth A., Vining, G. Geoffrey, (2002), Introducción al análisis de la regresión lineal, 3a Edición, Patria Cultural, México, D.F. pp. 588.
62. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que se deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que se deben sujetarse los Terceros



autorizados, Centros de investigación O Instituciones Hospitalarias que realicen pruebas de biocomparabilidad, Secretaria de Salud, 2013.