



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Estudio de permeabilidad de las infusiones derivadas de *Hintonia latiflora* e *Hintonia standleyana* a través de la monocapa celular Caco-2.

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB DIANA ALI PÉREZ ESPINOZA

TUTORA: DRA. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ
Facultad de Química

Ciudad de México, Agosto de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Estudio de permeabilidad de las infusiones derivadas de *Hintonia latiflora* e *Hintonia standleyana* a través de la monocapa celular Caco-2.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB DIANA ALI PÉREZ ESPINOZA

TUTORA: DRA. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ



Ciudad de México, 2018

Jurado Asignado

Presidente:	Dra. Lilián Yopez Mulia
Vocal:	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal:	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Vocal:	Dra. Dea Herrera Ruiz
Secretario:	Dra. Inés Fuentes Noriega

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios 113 y de Cultivo Celular de la Unidad de Estudios Preclínicos (UNIPREC), ambos ubicados en el Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme nuevamente completar una etapa más en mi vida académica y darme el privilegio de recibir una educación de calidad.

A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz por permitirme continuar con mis estudios de posgrado dentro de su laboratorio, por alentarme y apoyarme durante todo este ciclo, pero sobre todo por brindarme su amistad y cariño.

Al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría (Número de becario: 566801

A los miembros del jurado: Dra. Lilián Yopez Mulia, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, Dra. Dea Herrera Ruiz y Dra. Inés Fuentes Noriega por el tiempo dedicado para revisar y corregir este trabajo. Gracias por sus valiosos comentarios.

Al personal de la UNIPREC, en especial a los M en C. Isabel Gracia García y Francisco Sánchez por permitirme realizar parte del trabajo experimental en el laboratorio de cultivo celular; de manera muy especial a Luis Romero por sus consejos y la asesoría técnica brindada.

A Yamilet García, Maritza Villanueva, Monse Rodríguez, Mariana Guerra, Miguel Cervantes, Roberto Sánchez y Sergio Robles, por su amistad y apoyo, pero sin duda por permitirme aprender más de la vida a su lado.

a

*Eugenia y Gregorio. Por mostrarme
el camino a la superación.*

Los amo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. <i>Hintonia latiflora</i>	2
2.2. <i>Hintonia standleyana</i>	2
2.3. 5- <i>O</i> -(β -D-apiofuranosil-(1-6)- β -D-glucopiranosil)-7-metoxi-3, 4'- dihidroxi-4 fenilcumarina.....	2
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
4. METODOLOGÍA.....	6
4.1 Método bioanalítico para cuantificar furosemida y ketoprofeno en estudios de transporte <i>in vitro</i> con células Caco-2.....	6
4.1.1. <i>Desarrollo del método</i>	6
4.1.2. <i>Evaluación del sistema</i>	6
4.1.2.1. <i>Precisión</i>	6
4.1.2.2. <i>Linealidad</i>	6
4.1.3. <i>Validación del método bioanalítico</i>	6
4.1.3.1. <i>Selectividad</i>	7
4.1.3.2. <i>Linealidad</i>	7
4.1.3.3. <i>Exactitud, precisión y recobro</i>	7
4.1.3.4. <i>Límite de cuantificación</i>	7
4.1.3.5. <i>Estabilidad de la muestra</i>	8
4.2. Método bioanalítico para la cuantificación de 5- <i>O</i> -(β -D-apiofuranosil- (1-6)- β -D-glucopiranosil)-7-metoxi-3, 4'- dihidroxi-4 fenilcumarina presente en las infusiones de la corteza de <i>Hintonia standleyana</i> y de las hojas de <i>Hintonia latiflora</i>	8
4.2.1. <i>Diseño experimental para el desarrollo del método</i>	8
4.2.2.1. <i>Evaluación del sistema</i>	9
4.2.2.2. <i>Precisión y linealidad</i>	10
4.2.3. <i>Validación del método</i>	10
4.2.3.1. <i>Linealidad</i>	10
4.2.3.3 <i>Exactitud, precisión y recobro</i>	10
4.2.3.4. <i>Límite de cuantificación</i>	10
4.2.3.5. <i>Estabilidad de la muestra</i>	10
4.3. Cultivo celular	10
4.3.1. <i>Preparación de medios utilizados para el cultivo celular</i>	10
4.3.2. <i>Descongelamiento y proliferación celular</i>	11
4.3.3. <i>Tripsinización y conteo celular</i>	11
4.3.4. <i>Ensayo de inhibición de la proliferación celular (citotoxicidad)</i>	11
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1 Método bioanalítico para la cuantificación de furosemida y ketoprofeno en estudios de transporte <i>in vitro</i> con células Caco-2.....	13
5.2 Evaluación de los parámetros de desempeño	14
5.2.1 <i>Adecuabilidad del sistema</i>	14
5.2.2 <i>Linealidad del sistema</i>	14
5.2.3 <i>Validación del método</i>	16
5.2.3.2 <i>Linealidad del método</i>	16
5.2.3.3 <i>Precisión y Exactitud</i>	17

5.2.3.4 Recobro	19
5.2.3.5 Límite de cuantificación.....	19
5.2.3.6 Estabilidad de la muestra.....	20
5.2.3.1 Selectividad	21
4.2. Método bioanalítico para la cuantificación de 5-O-(β -D-apiofuranosil- (1-6)- β -D-glucopiranosil)-7-metoxi-3, 4'- dihidroxi-4 fenilcumarina presente en las infusiones de la corteza de <i>Hintonia standleyana</i> y de las hojas de <i>Hintonia latiflora</i>	22
4.2.1.6 Diseño de experimentos.....	22
5.3.2 Evaluación del sistema.....	22
5.3.2.1 Precisión.....	22
5.3.2.2 Linealidad.....	23
5.3.3 Validación del Método	23
5.3.3.1 Linealidad del método.....	24
5.3.3.2 Precisión y Exactitud	24
5.3.3.4 Límite de cuantificación.....	24
5.3.3.5 Estabilidad de la muestra.....	25
5.4 Cultivo celular	25
5.5 Ensayo de citotoxicidad	25
6. CONCLUSIONES	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	28

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. El incremento en el interés y el consumo de la medicina herbolaria no solo se refleja en las altas ventas de estos productos sino también, en las múltiples publicaciones de textos sobre farmacología, toxicología, botánica, química y algunos aspectos clínicos de plantas medicinales. Actualmente, existe una marcada tendencia por utilizar terapias que combinan fármacos ortodoxos con medicina herbolaria. Una de las principales consecuencias de esta modalidad son las posibles interacciones farmacocinéticas entre ambos productos. La interacción de los fármacos alopáticos, especialmente los de estrecho margen terapéutico (warfarina, digoxina), con los medicamentos herbolarios es de particular interés debido a que el remedio medicinal puede alterar la farmacocinética y la biodisponibilidad de los fármacos alopáticos. Por otra parte, en los países desarrollados existe un marcado 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 el proceso de manufactura. De manera general, los factores de la formulación que afectan la biodisponibilidad y la bioequivalencia 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.

Agencias regulatorias como la Food and Drug Administration (FDA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la EMA han adoptado el BSC (sistema de clasificación biofarmacéutica) como estándar para establecer la biodisponibilidad/bioequivalencia de formas farmacéuticas sólidas sujetas a un proceso de aprobación. Actualmente, la FDA y la European Medicines Agency (EMA) pueden exentar a los fármacos de Clase I (alta solubilidad y alta permeabilidad), que se incorporen en formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata, de realizar un estudio de bioequivalencia *in vivo*. La EMA también utiliza este criterio para los fármacos Clase III (alta solubilidad y baja permeabilidad). A pesar de que el BSC se ha utilizado con éxito en el ámbito de la medicina alópata su validez y aplicación, en la medicina herbolaria, ha recibido poca atención. Debido a que en numerosas regiones del mundo los insumos herbolarios no requieren de un estricto proceso de aprobación, los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, para estos productos no se han realizado. Este vacío en el aspecto regulatorio ha propiciado inconsistencias: en los procesos de manufactura y en la selección adecuada de los excipientes incluidos en las formulaciones de los productos herbolarios que se venden mundialmente. Aún más, la falta de aseguramiento de calidad ha ocasionado toxicidad, efectos adversos, interacciones planta-fármacos y falta de eficacia.

2. ANTECEDENTES

Hintonia latiflora, *Hintonia standleyana* y *Exostema caribaeum*, conforma un complejo de plantas medicinales conocida como complejo copalchi; dicho complejo se define como un grupo de plantas que reciben el mismo nombre en común, comparten características morfológicas y/o aromáticas y les son atribuidas propiedades curativas similares. El complejo copalchi, se caracteriza por tener cortezas amargas y emplearse como sustitutos de las quinas, usadas en el tratamiento de las fiebres palúdicas. En la actualidad su uso como agentes antidiabéticos y gastroprotectores se ha popularizado en el país (Linares y Bye, 1987; Anaya, 1991).

2.1. *Hintonia latiflora*

H. latiflora es la especie pilar del complejo; es una planta no sólo de amplio uso en la medicina tradicional sino también con una amplia historia que data de más de 400 años de antigüedad. Su corteza es altamente valorada por sus propiedades antidiabéticas (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; Díaz, 1976, Bye, 1989; Martínez, 1989).

H. latiflora es un arbusto o árbol de hasta 8 metros de alto propio del bosque tropical caducifolio. La principal zona de abasto comercial está al norte del estado de Guerrero, México. Recibe varios nombres comunes, como son campanilla, campanillo, cáscara sagrada, copalchi, copalchile, copalquín, corteza de Jojutla, palo amargo, palo amargoso, y palo copalche por mencionar algunos (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; Díaz, 1976, 2007; Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994).

La infusión de la corteza de *H. latiflora* se utiliza para tratar problemas digestivos; como purgante; contra el dolor de estómago, el empacho, la gastritis, la úlcera gástrica y la gastroenteritis, o bien, como digestivo. También, se utiliza para tratar enfermedades de la vesícula biliar. El uso de la infusión de la corteza como antidiabético es quizás el uso más difundido hoy en día (Cristians, 2013).

2.2. *Hintonia standleyana*

H. standleyana es un árbol o arbusto de hasta seis metros de alto y su tronco está cubierto por una corteza suberosa. Esta especie se distribuye en los estados de Guerrero, Oaxaca y Veracruz, así como en Guatemala en el bosque tropical caducifolio (Borhidi, 2006). Entre los nombres comunes atribuidos a esta especie están los siguientes: copalchi, copalchi de Jojutla, falsa quina y quina amarilla. En la medicina tradicional la especie es utilizada como antidiabético, febrífugo, antipalúdico, antiparasitario, para tratar la gastritis, trastornos gastrointestinales y úlceras gástricas (Díaz 1976; Gonzáles-Chávez, 2000; Monroy y Castillo- España, 2007).

2.3. 5-O-(β -D-apiofuranosil-(1-6)- β -D-glucopiranosil)-7-metoxi-3, 4'- dihidroxi-4 fenilcumarina

El estudio fitoquímico de las hojas de *H. latiflora* y la corteza de *H. standleyana* ha permitido el aislamiento y la caracterización de algunos derivados de 4-fenilcumarinas. Este grupo de constituyentes ha sido identificado como los responsables de la actividad antidiabética y gastroprotectora.

En estudios farmacológicos recientes se caracterizó el efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico de las especies en estudio. Dichos estudios mostraron que a pesar de las similitudes en la composición química de las plantas el mejor hipoglucemiante es el extracto acuoso de *H. latiflora*, mientras que, el mejor efecto antihiper glucémico lo presenta el extracto acuoso de la corteza de *H. standleyana*. Estos efectos farmacológicos están relacionados con sus contenidos de metabolitos secundarios con propiedades antidiabéticas, principalmente las 4-fenilcumarinas. La caracterización de compuestos

selectos permitió establecer a la 5-O-(β-D-apiofuranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil)-7-metoxi-3, 4'- dihidroxi-4 fenilcumarina (**Figura 2.1**) como uno de los principios activos presente en la corteza de *H. standleyana* y las hojas de *H. latiflora* (Cristians *et al*, 2009).

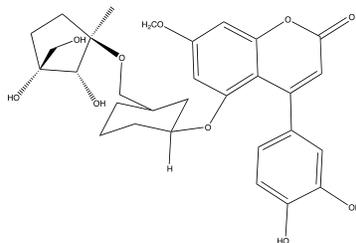


Figura 2.1 Estructura química de (1)

2.4. Sistema de clasificación biofarmacéutica

La permeabilidad, la solubilidad y la disolución son los principales factores que influyen en la absorción de un fármaco. La permeabilidad refleja las propiedades fisiológicas de la membrana hacia los solutos; la fracción de fármaco absorbida está determinada entonces por la permeabilidad del fármaco a través de la pared intestinal. Por otra parte, la solubilidad es una de las propiedades fisicoquímicas del fármaco que afectan la absorción, debido a que es necesario que el fármaco se encuentre en disolución para que se lleve a cabo dicho proceso (Cao *et al.*, 2008).

Estas características biofarmacéuticas influyen, además, en la distribución, el metabolismo y la excreción y son adecuadas para lograr el efecto terapéutico *in vivo*. En el año 2000, la FDA implementó en una de sus guías, el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB): una pauta para clasificar los fármacos con base en su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal (**Tabla 2.1**). Este documento considera además la exención de pruebas de bioequivalencia entre diferentes formulaciones de fármacos pertenecientes a la clase 1. Por otra parte, también establece que en el desarrollo de nuevos fármacos es adecuado catalogar a las moléculas de acuerdo con el SCB para poder predecir sus características de absorción (FDA, 2000).

En este sentido, se considera que un fármaco es altamente soluble cuando la dosis más alta se disuelve en 250 mL o menos en un medio acuoso dentro de un intervalo de pH de 1 a 7.5 (FDA, 2000). Con respecto a la permeabilidad se sabe que un fármaco es altamente permeable cuando su absorción, en humanos, es del 90% o más de una dosis administrada con una determinación del balance de masa. El límite se basa indirectamente en el grado de absorción del fármaco en humanos y, directamente en las mediciones de la proporción de transferencia de masa a través de la membrana intestinal humana o en modelos alternativos (FDA, 2000).

Tabla 2.1 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

	Solubilidad	Permeabilidad
Clase 1	Alta	Alta
Clase 2	Baja	Alta
Clase 3	Alta	Baja
Clase 4	Baja	Baja

Se han desarrollado diversos métodos para determinar la permeabilidad de los fármacos. De manera general, se pueden clasificar como métodos fisicoquímicos, *in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. De éstos, 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.

La línea celular Caco-2 representa el modelo de barrera intestinal más empleado y mejor caracterizado para predecir la absorción de fármacos. Las células Caco-2 derivan del carcinoma del colon humano y durante su cultivo, van adquiriendo y/o expresando algunas características de las células intestinales como son las microvellosidades; los transportadores de proteínas, las proteínas de eflujo, la fase II de los sistemas enzimáticos de conjugación y los sistemas de transformación metabólico de fármacos. En otras palabras, la permeabilidad de los fármacos a través de la monocapa de células Caco-2 correlaciona con la absorción de la membrana intestinal *in vivo* haciendo posible los estudios de relación estructura-absorción (Hubatsch *et al.*, 2007).

Para demostrar la adecuabilidad de un método enfocado a determinar la BSC 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 en métodos de cultivo de células epiteliales (Jin *et al.*, 2014)

Con base en estas consideraciones la originalidad de este proyecto reside en establecer la clasificación biofarmacéutica de un marcador obtenido a partir de dos especies medicinales mexicanas. Para validar el modelo de permeabilidad *in vitro* se emplearán dos fármacos modelo descritos en la guía de la FDA (ketoprofeno y furosemida; fármacos clasificados como marcadores de alta y moderada permeabilidad, respectivamente). En esta investigación también se definen los parámetros para: cultivar las células; evaluar el transporte en las direcciones apical-basolateral y basolateral-apical; establecer las concentraciones a ensayar y el tiempo de análisis.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la permeabilidad aparente del 5-O-(β -D-apiofuranosil-(1-6)- β -D-glucopiranosil)-7-metoxi-3,4'-dihidroxi-4 fenilcumarina (**1**) presente en las infusiones de *Hintonia sandleyana* e *Hintonia latiflora* mediante un modelo *in vitro* utilizando la línea celular Caco-2.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar y validar un método bioanalítico apropiado para cuantificar los marcadores de alta y mediana permeabilidad en la matriz biológica. Los parámetros de calidad que se evaluarán son: la linealidad, la precisión, la selectividad, la exactitud, el recobro y la estabilidad de la muestra.
- Desarrollar y validar un método bioanalítico apropiado para cuantificar (**1**) en la matriz biológica. Para establecer las condiciones de separación óptimas se empleará un diseño de experimentos. Los parámetros de desempeño del método que se evaluarán son: linealidad, precisión, selectividad, exactitud, recobro y estabilidad de la muestra.
- Generar un banco celular maestro y uno de trabajo para la línea celular Caco-2. Esta actividad permitirá asegurar el suministro uniforme y adecuado de las células.
- Demostrar la adecuabilidad de un modelo *in vitro* con la línea celular Caco-2 enfocado a determinar la permeabilidad aparente de (**1**) presente en las infusiones de *Hintonia sandleyana* e *Hintonia latiflora* estableciendo una relación orden-categoría entre los valores de permeabilidad obtenidos experimentalmente con dos fármacos modelo (furosemida y ketoprofeno) y sus correspondientes valores reportados en la literatura.
- Evaluar la citotoxicidad de las infusiones de *H. sandleyana* e *H. latiflora*, así como el producto puro (**1**) sobre la línea celular Caco-2 en un intervalo que considere las concentraciones de exposición de las infusiones durante el estudio de permeabilidad.
- Determinar el coeficiente de permeabilidad aparente (Paap) de (**1**), en el sentido apical-basolateral (AP-BS) y basolateral-apical (BS-AP) del compuesto (**1**) presente en las infusiones de *H. sandleyana* e *H. latiflora* empleando tres diferentes concentraciones.

4. METODOLOGÍA

4.1 Método bioanalítico para cuantificar furosemida y ketoprofeno en estudios de transporte *in vitro* con células Caco-2.

4.1.1. Desarrollo del método

El desarrollo y la validación del método bioanalítico se realizó en 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-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution.

El análisis cuantitativo por cromatografía de líquidos se llevó a cabo empleando una columna Symmetry® C18 con un tamaño de partícula de 5 µm (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno). La fase móvil empleada consistió en una mezcla binaria de disolventes compuesta por CH₃CN:H₂O pH 3.1 (0.2% ácido acético) [50:50] a un flujo de 1.0 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL. Las longitudes de onda utilizadas fueron 270 nm y 254 nm para furosemida y ketoprofeno, respectivamente.

Las soluciones de los fármacos empleadas en todos los ensayos fueron preparadas utilizando estándares marca Sigma Aldrich (99.0% y 98.0% de pureza, respectivamente).

4.1.2. Evaluación del sistema

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se evaluaron la linealidad y la precisión del sistema. Para ello, se preparó una solución stock de cada compuesto, a una concentración de 1 000 µM, usando como disolvente MeOH. A partir de esta solución se realizaron las diluciones correspondientes utilizando fase móvil como disolvente.

4.1.2.1. Precisión

La precisión del sistema se determinó mediante el análisis de cinco réplicas de soluciones preparadas en tres niveles de concentración (10, 60 y 130 µM) para cada fármaco. Cada nivel se preparó diluyendo, convenientemente, la solución stock (1 000 µM) con fase móvil. Una vez registrada la respuesta analítica se determinó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración.

4.1.2.2. Linealidad

La linealidad se determinó a partir de tres curvas de calibración, con diez niveles de concentración para cada analito (1, 2.5, 5, 15, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 µM). Cada curva se preparó por medio de diluciones independientes a partir de la solución stock de cada compuesto. Una vez que las muestras fueron analizadas con el método cromatográfico se realizó, con los datos obtenidos, una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.

4.1.3. Validación del método bioanalítico

La validación del método se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la revisión 1 de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA en el 2015. De acuerdo con esta guía, los parámetros de desempeño que se deben evaluar para validar los métodos bioanalíticos cromatográficos son: la selectividad, la linealidad, la precisión, la

exactitud, el recobro, el límite de cuantificación y la estabilidad de la muestra. La validación de los métodos se realizó de manera simultánea para furosemida y ketoprofeno.

Todas las soluciones empleadas en la validación del método se realizaron diluyendo la solución stock, de cada analito, con la solución amortiguadora de Hank pH 7.4.

4.1.3.1. Selectividad

Se analizaron seis blancos de muestras que contenían la solución amortiguadora de Hank pH 7.4 (HBSS) en contacto directo con la monocapa celular Caco-2, en placas Transwell, a 37°C por 3 h; también, se analizaron muestras de la solución HBSS sin estar en contacto con las células y soluciones de furosemida y ketoprofeno a la concentración de 100 μM en solución amortiguadora de Hank. Una vez obtenidos los cromatogramas correspondientes, se buscó la presencia de alguna interferencia sobre la respuesta generada por el furosemida y ketoprofeno.

4.1.3.2. Linealidad

Se determinó preparando, en diferentes días, seis curvas de calibración en el intervalo de 1 μM a 150 μM para cada analito. Cada curva se analizó en el sistema cromatográfico. Para evaluar este parámetro de desempeño los datos analíticos se analizaron por medio de una regresión lineal con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.

4.1.3.3. Exactitud, precisión y recobro

Para evaluar estos parámetros de desempeño se preparó, por quintuplicado, una muestra que contenía ambos fármacos (en la matriz biológica; solución HBSS) en concentraciones de 10 μM (bajo), 60 μM (medio) y 130 μM (alto).

Con los datos obtenidos se determinó la exactitud del método mediante el cálculo de la concentración recuperada; el valor promedio de dicha concentración se utilizó para calcular la desviación absoluta respecto al valor nominal de las concentraciones evaluadas.

La precisión se estimó a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. La primera, se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido con la concentración recuperada en las muestras para cada nivel de concentración. El segundo parámetro de desempeño se determinó evaluando la variación de la concentración recuperada, en cada nivel, a partir de muestras preparadas por dos analistas y en dos días diferentes.

Finalmente, para evaluar el recobro se preparó, adicionalmente, una segunda serie de muestras en los mismos niveles de concentración y utilizando fase móvil como disolvente. El recobro fue evaluado comparando las respuestas analíticas entre las muestras preparadas con la fase móvil y las muestras preparadas con la matriz biológica.

4.1.3.4. Límite de cuantificación

Para estimar el límite de cuantificación se realizaron diluciones seriales de cada fármaco hasta encontrar la concentración mínima que presentara una respuesta identificable de por lo menos cinco veces la señal de ruido (comparada con el blanco), con un coeficiente de variación menor al 20% y una exactitud en la concentración recuperada del $\pm 20\%$. Para ello, las muestras se prepararon por quintuplicado y se analizaron en el sistema cromatográfico.

4.1.3.5. Estabilidad de la muestra

Se evaluó la estabilidad de cada compuesto en solución HBSS pH 7.4 a corto y a largo plazo; también, se determinó la estabilidad después de tres ciclos de congelación-descongelación.

- **Estabilidad de las muestras a corto plazo**

Para evaluar la estabilidad de las muestras a corto plazo se prepararon, por triplicado, las soluciones muestra en tres niveles de concentración: 10, 60 y 130 μM . Previo a su análisis cromatográfico las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 h. Con los resultados obtenidos se calculó la concentración recuperada, su desviación absoluta respecto al valor nominal y la desviación estándar.

- **Estabilidad de las muestras a largo plazo**

Para evaluar este parámetro se empleó la misma estrategia metodológica descrita en el párrafo anterior. La única diferencia reside en las condiciones de almacenamiento de las muestras: $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 días.

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

En esta condición, la estabilidad se evaluó en tres ciclos. De nueva cuenta, se prepararon tres series de muestras utilizando la misma metodología que para la estabilidad a corto y largo plazo. El primer ciclo se evaluó congelando las series a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez que se congelaron las muestras se retiraron del congelador y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su descongelación total. Al término de este ciclo una alícuota de la muestra se analizó empleando el método bioanalítico desarrollado; el resto de la solución se almacenó a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para iniciar el segundo ciclo. El procedimiento se repitió hasta completar los tres ciclos. Con los datos analíticos obtenidos, en cada ciclo, se determinó la concentración recuperada, su desviación absoluta respecto al valor nominal y la desviación estándar.

4.2. Método bioanalítico para la cuantificación de 5-O-(β -D-apiofuranosil-(1-6)- β -D-glucopiranosil)-7-metoxi-3, 4'- dihidroxi-4 fenilcumarina presente en las infusiones de la corteza de *Hintonia standleyana* y de las hojas de *Hintonia latiflora*.

4.2.1. Diseño experimental para el desarrollo del método

Para establecer las condiciones cromatográficas óptimas de cuantificación del 5-O-(β -D-apiofuranosil-(1-6)- β -D-glucopiranosil)-7-metoxi-3, 4'- dihidroxi-4 fenilcumarina (**1**) se realizó un diseño de experimentos 2^3 . Los factores evaluados fueron: la concentración de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich), la proporción de CH_3CN (Merck) en la fase móvil y el flujo para ambas infusiones. Los niveles para cada factor se enlistan en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1 Factores evaluados en el diseño experimental de las infusiones derivadas de *H. standleyana* y *H. latiflora*

Factor	<i>H. standleyana</i>		<i>H. latiflora</i>	
	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo
Concentración de TFA (%)	0.1	0.01	0.1	0.01
Proporción de CH ₃ CN (%)	20	16	20	12
Flujo (mL/min)	1.0	0.6	0.7	0.5

La aleatorización del diseño se realizó utilizando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI. En todos los experimentos se prepararon las infusiones con una concentración de 30-35 µM de (**1**).

Las respuestas evaluadas a partir del diseño experimental fueron: el tiempo de retención y la resolución del compuesto **1**. La influencia de cada uno de los factores sobre las respuestas mencionadas se determinó a través del software estadístico mencionado en el párrafo anterior. Adicionalmente, se realizó un análisis de optimización de respuesta múltiple con el que se establecieron, finalmente, las condiciones cromatográficas del método para cuantificar (**1**) en las infusiones de *Hintonia standleyana* y *Hintonia latiflora*.

4.2.2. Validación de los Métodos bioanalíticos.

El análisis cuantitativo por cromatografía de líquidos para evaluar (**1**) en las infusiones de la corteza de *Hintonia standleyana* y de las hojas de *Hintonia latiflora* se llevó a cabo empleando una columna Symmetry® C18 con un tamaño de partícula de 5 µm (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno). Las condiciones cromatográficas utilizadas para validar el método analítico de la infusión derivada de *H. standleyana* se describen en la **Tabla 4.2**. El flujo fue de 0.4 mL/min, el volumen de inyección de 20 µL y la longitud de onda utilizada fue de 327. Por otra parte, para evaluar el marcador (**1**) en la infusión de *H. latiflora* se utilizó una fase móvil compuesta por CH₃CN:H₂O (0.1% ácido trifluoroacético) [16:84]; un flujo de 0.6 mL/min; un volumen de inyección de 20µL y una longitud de onda de 327.

Tabla 4.2. Gradiente de elución utilizado para cuantificar (**1**) en la infusión de *H. standleyana*

Tiempo (minutos)	CH ₃ CN (%)	H ₂ O (%)	Elución
0-7	16-30	84-70	Gradiente
7-10	30	70	Isocrático
10-15	30-16	70-84	Gradiente
15-25	16	70	Isocrático

Para el desarrollo y la validación de los métodos bioanalíticos se utilizó un estándar de 5-O-(β-D-apiofuranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil)-7-metoxi-3,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**1**) previamente aislado y purificado a partir de sus fuentes naturales. El metabolito fue identificado y caracterizado por técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales (Cristians *et al.*, 2013).

4.2.2.1. Evaluación del sistema

Para evaluar la linealidad y la precisión del sistema en ambas infusiones se preparó una solución stock de (**1**), en agua (Milli Q), a una concentración de 1 000 µM. Esta solución se utilizó para preparar el resto de las soluciones involucradas en la validación del sistema y del método. Para la evaluación del sistema, todas las soluciones se llevaron a volumen con la fase móvil.

4.2.2.2. Precisión y linealidad

Para evaluar la precisión del sistema se utilizó la metodología descrita en el inciso 4.1.2.1. Las concentraciones utilizadas fueron: 12.5, 27.5 y 42.5 μM .

La linealidad se determinó preparando diversas curvas de calibración con concentraciones de 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 μM . Para ello, se utilizó la metodología descrita en 4.1.2.2.

4.2.3. Validación del método

La validación del método analítico se realizó empleando los criterios descritos en el inciso 4.2.2. El protocolo experimental se realizó de manera independiente para cada infusión.

Las soluciones empleadas para la validación del método se prepararon a partir de una solución stock de **1**, disuelto en solución amortiguadora de Hank pH 7.4 a una concentración de 1 000 μM .

4.2.3.1. Linealidad

Este parámetro de calidad se evaluó para cada infusión de acuerdo con lo indicado en el apartado 4.2.2.3.

4.2.3.3 Exactitud, precisión y recobro

Estos parámetros de desempeño se evaluaron a través de la preparación de muestras por quintuplicado en 3 niveles de concentración: 12.5 μM (bajo), 27.5 μM (medio) y 42.5 μM (alto).

La determinación de la exactitud, precisión y recobro se realizó de la misma manera que en la validación del método para furosemida y ketoprofeno (numeral 4.1.2.3).

4.2.3.4. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se realizó estimando la concentración mínima de **1** que pudiera ser detectable en ambas infusiones y, que además, presentara una exactitud y precisión aceptable de acuerdo con los criterios establecidos en la Guía emitida por la FDA, $\pm 20\%$ y $\leq 20\%$, respectivamente. Para esta estimación, se realizaron diluciones sucesivas hasta que se encontró la mínima concentración que cumpliera con los requerimientos. Se trabajaron cinco réplicas para evaluar la precisión y la exactitud de este parámetro de calidad.

4.2.3.5. Estabilidad de la muestra

La estabilidad de la muestra se evaluó utilizando las mismas condiciones descritas en el numeral 4.1.2.5; la estabilidad se determinó a corto y largo plazo y en ciclos de congelación-descongelación. Para ello, se prepararon muestras a tres niveles de concentración: alto (42.5 μM), medio (27.5 μM) y bajo (12.5 μM) de (**1**) tanto para la infusión de *H. standleyana* como de *H. latiflora*.

4.3. Cultivo celular

Las células de adenocarcinoma de colon humano [Caco-2] (ATCC[®] HTB-37[™]) fueron adquiridas en la American Type Culture Collection con el número de lote 61777387. La manipulación de la línea celular se realizó en condiciones de esterilidad empleando para ello una campana de flujo laminar clase II, tipo A2, Nuair Labguard, modelo UN-425-300.

4.3.1. Preparación de medios utilizados para el cultivo celular

Para la proliferación de la línea celular se empleó el medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) adicionado con 20% de suero fetal bovino (SFB, ATCC[®] 30-2020).

4.3.2. Descongelamiento y proliferación celular

Para descongelar el criotubo que contenía las células conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en SFB y 5% DMSO se frotó suavemente con las manos hasta obtener una suspensión homogénea. En condiciones asépticas, la suspensión celular se vertió completamente en un tubo Falcon que contenía 5 mL de medio de lavado Ham's F-12; se homogenizó y se centrifugó utilizando una centrifuga marca Hettich Rotina a 1500 rpm y $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se decantó y el botón celular se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo. Para inicial la proliferación la suspensión celular se colocó en una botella Corning de 25 cm^2 . La botella se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera húmeda y con 5% de CO_2 (Estufa Shel Lab modelo 3552). El medio de cultivo se cambió cada 48 horas hasta que las células llegaron a una confluencia del 80-90%, la cual se determinó mediante la observación del cultivo en un microscopio invertido marca Olympus CKX49.

4.3.3. Tripsinización y conteo celular

Una vez que el cultivo llegó a confluencia las células se desprendieron de la botella de cultivo mediante la adición de tripsina. Para ello, se realizó lo siguiente: en primer lugar se aspiró el medio; enseguida las células se lavaron con 3 mL de medio Ham's F12, en dos ocasiones, aspirando en cada lavado el medio. A continuación, se adicionó 1 mL de Tripsina-EDTA [0.25% / 0.53 mM] (ATCC, 30-2101) por cada 25 cm^2 de superficie de la botella. Ésta se incubó por 5 minutos y se comprobó el desprendimiento celular a través del microscopio. Finalmente, se agregaron 3 mL de medio de lavado Ham's F-12, para detener la acción de la tripsina, la solución se centrifugó a 1500 rpm y $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo.

Una vez homogenizada la suspensión celular en un vórtex (IKA MS2) se tomó una alícuota de 50 μL y se mezcló con 50 μL de Azul Tripiano al 0.4% (Gibco) en un tubo Eppendorff de 0.5 mL de capacidad. El conteo de células no teñidas se realizó en una cámara de Neubauer empleando 20 μL de la suspensión y el objetivo 10x del microscopio.

4.3.4. Ensayo de inhibición de la proliferación celular (citotoxicidad)

Para evaluar la citotoxicidad se utilizó el método colorimétrico de Sulforrodamina B (SRB) en placas de 96 pozos tipo ELISA estériles las cuales se dividieron en cuadrantes.

Para evaluar la citotoxicidad de las infusiones y el compuesto **1**, las muestras se prepararon a partir de una solución 10 mM de cada compuesto. De esta solución, se realizaron diluciones subsecuentes hasta obtener concentraciones de 400, 200, 100 y 10 μM empleando como diluyente agua.

Por otra parte, para evaluar el efecto del cosolvente (DMSO) y el diluyente se realizó una disolución 1:10 de DMSO en agua. De la solución resultante se prepararon 4 diluciones adicionales (4:10, 2:10, 1:10 y 0.1:10), empleando en todos los casos, agua. Para el control positivo (cis-platino) se preparó una solución stock de cis-platino a 5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T. Baker). De esta solución se prepararon concentraciones logarítmicas de 100, 10, 1 y 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En condiciones asépticas se transfirieron, a cada pozo, 100 μL de medio y 20 μL de una suspensión celular a una concentración de 1×10^6 células/mL (2×10^4 células/pozo). Posteriormente, la placa se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, con 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio de cada pozo y se adicionaron 90 μL de medio fresco y 10 μL de las soluciones de prueba. Para cada infusión las concentraciones finales fueron de 40, 20, 10 y 1 μM , mientras que para cis-platino y el DMSO las concentraciones evaluadas fueron 10, 1.0, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 40, 20, 10 y 1, respectivamente. A los pozos empleados como blanco se adicionaron 100 μL de

medio de cultivo y en los pozos empleados como control positivo, 100 μ L del agente citotóxico (cisplatino y DMSO al 30%). La evaluación de las soluciones se realizó por triplicado. De nueva cuenta, las placas se incubaron durante 24 h bajo las condiciones descritas anteriormente. Al término de este segundo periodo de incubación se retiró la solución de cada pozo y las células se fijaron con 100 μ L de ácido tricloroacético al 10% (JT Baker); las placas se dejaron en reposo a 4 °C durante 1 h. Posteriormente, se lavaron 5 veces con agua destilada hasta retirar el exceso de ácido y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas, las células se tiñeron con 50 μ L de Sulforrodamina B al 0.4% (Sigma Aldrich) en ácido acético al 1% (JT Baker), incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se retiró el exceso de colorante lavando 5 veces con ácido acético al 1% y se llevó a cabo un segundo proceso de secado a temperatura ambiente. Por último, el colorante se disolvió con 100 μ L de una solución Tris Base 10 mM (pH 10.5) dejando reposar por 5 minutos con agitación mecánica suave, hasta lograr la disolución homogénea del colorante. La absorbancia de cada pozo se registró en un lector de placas Agile Reader (Avans, AMPR-900) a 564 nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Método bioanalítico para la cuantificación de furosemida y ketoprofeno en estudios de transporte *in vitro* con células Caco-2.

Para demostrar la aptitud del modelo de permeabilidad empleado para clasificar al compuesto **1** se seleccionó, en primer lugar, dos fármacos modelo con características de alta y moderada permeabilidad (ketoprofeno y furosemida). Para ambos fármacos, la literatura farmacológica describe sus mecanismos de absorción y el orden de los valores del coeficiente de permeabilidad.

Así, para evaluar el transporte de estos fármacos a través de la monocapa celular se desarrolló un método bioanalítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, con detección UV, para los marcadores seleccionados. Para ello, se revisaron los métodos cromatográficos publicados en la literatura. De acuerdo con las condiciones cromatográficas reportadas, se probaron distintas proporciones de disolvente y columnas. En cada caso se evaluó la forma de los picos y el tiempo de retención de ketoprofeno y furosemida. La óptima resolución de los constituyentes en la muestra se obtuvo con las siguientes condiciones cromatográficas:

Tabla 5.1. Condiciones cromatográficas del método bioanalítico

Fase móvil	Ácido acético (0.2%) pH 3.1: CH ₃ CN (50:50)
Columna	Symmetry® C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm)
Temperatura	Ambiente
Flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Longitud de onda de detección	Ketoprofeno 254nm y Furosemida 270 nm

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas del método se calcularon los siguientes parámetros: la resolución (R), el factor de capacidad (k'), el factor de coe (T) y el tiempo de retención (tr). Los valores para cada parámetro cromatográfico del método se resumen la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2. Parámetros cromatográficos obtenidos para furosemida y ketoprofeno con el método desarrollado

	Furosemida	Ketoprofeno
Tiempo de retención(tr):	4.543	7.544
Factor de capacidad (k')	0.0	0.716
Resolución (R)	11.321	
Factor de coe (T)	0.980	1.059

De acuerdo con los valores estimados para cada uno de dichos parámetros, el método desarrollado, cumple con las especificaciones recomendadas para métodos cromatográficos ($k' > 2$; $T < 2$; $R > 2$).

En la **Figura 5.1** se ilustra el perfil cromatográfico de una solución de furosemida y ketoprofeno a una concentración de 100 µM

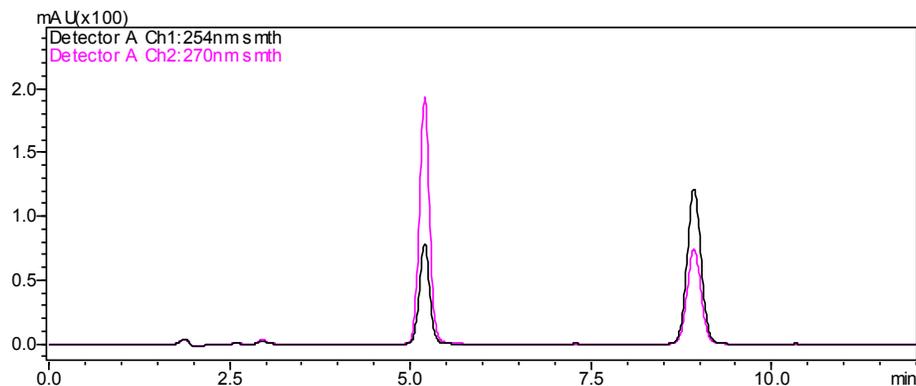


Figura 5.1 Cromatograma obtenido con la solución de furosemida y ketoprofeno a una concentración de 100 μM

5.2 Evaluación de los parámetros de desempeño

5.2.1 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema es una parte integral de muchos procedimientos analíticos, entre ellos, los cromatográficos. Esta prueba se basa en el concepto de que el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que van a ser analizadas constituyen un sistema integral, que puede ser evaluado como tal. La adecuabilidad del sistema permite establecer la confiabilidad del sistema, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método (FEUM, 2014).

Este criterio de calidad se determinó mediante el análisis, por sextuplicado, de una solución de furosemida y ketoprofeno a una concentración de 60 μM . Los resultados obtenidos permitieron estimar que la resolución, entre las señales, es mayor a 2.0 y el coeficiente de variación entre las réplicas es menor a 2.0%. Por lo tanto, el sistema en general, es adecuado para la aplicación que se pretende.

Tabla 5.3. Adecuabilidad del sistema

Concentración	Furosemida	Ketoprofeno
60 μM	1574461	1400275
60 μM	1569741	1410648
60 μM	1582959	1422008
60 μM	1590234	1414737
60 μM	1578116	1399806
60 μM	1570462	1408780
Promedio	1577662.17	1409375.67
s	7201.25164	7796.30303
CV	0.4	0.5

5.2.2 Linealidad del sistema

Un sistema es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo, en un rango de concentraciones establecidas, son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (ICH Q2(R1), 2005; FDA, 2015).

El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos calculados se resumen en la **Tabla 5.4**

Tabla 5.4. Parámetros estadísticos de la regresión lineal

Parámetros estadísticos	Furosemida	Ketoprofeno
Ordenada al origen (β_0)	-11206.8	-18892.9
Pendiente de la recta (β_1)	28257.5	25644.4
Coefficiente de correlación (r)	0.9996	0.99966
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9991	0.9993

Como se deduce del análisis estadístico el valor del coeficiente de correlación sugiere una relación lineal entre el área y la concentración. El coeficiente de determinación (r^2) permite establecer que el 99.9 % de la variabilidad en la respuesta se encuentra explicada por dicho modelo. Finalmente, en las **Tablas 5.5 y 5.6** se resumen los intervalos de confianza al 95 % para la ordenada al origen y para la pendiente. En las **Tablas 5.7 y 5.8** se ilustra el análisis de varianza (ANOVA) con el objetivo de comparar las curvas y estimar los componentes de variación en la linealidad del sistema. Como se observa el valor calculado de F es mayor que su valor crítico; por lo que se concluye que el modelo describe una relación lineal entre las variables.

Tabla 5.5 Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema de furosemida

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-18892.86812	8301.470164	-2.275846054	0.031685224	-35990.06596	-1795.670268
Pendiente de la recta (β_1)	25644.41944	133.8245871	191.6271142	4.05412E-41	25368.80254	25920.03634

Tabla 5.6 Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema de ketoprofeno

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-11206.77828	9960.946066	-1.125071675	0.271244648	-31721.73072	9308.174167
Pendiente de la recta (β_1)	28257.45631	160.5763158	175.9752437	3.40699E-40	27926.74319	28588.16942

Tabla 5.7. Análisis de varianza para el modelo de linealidad del furosemida

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	4.06929E+13	4.06929E+13	30967.2864	3.40699E-40
Residuos	25	32851494549	1314059782		
Total	26	4.07257E+13			

Tabla 5.8. Análisis de varianza para el modelo de linealidad del ketoprofeno

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	3.35149E+13	3.35149E+13	36720.9509	4.05412E-41
Residuos	25	22817285566	912691422.6		
Total	26	3.35377E+13			

Por otra parte, la distribución de los datos en la gráfica de residuales (resultados no ilustrados) sugiere que la varianza de los errores es constante para ambos fármacos por lo tanto, el modelo de regresión lineal es adecuado para la aplicación que se pretende. Con base en el análisis estadístico realizado se establece que el sistema es lineal para cuantificar furosemida y ketoprofeno en el intervalo de concentraciones establecido.

Precisión del sistema

La precisión de un método analítico expresa la concordancia entre una serie de mediciones independientes. La precisión puede ser evaluada a través de los siguientes niveles: precisión del sistema, precisión del método y precisión intermedia (FEUM, 2014).

La precisión del sistema se refiere a la variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica, que puede ser originada por el analista, equipo o instrumentos de medición (FEUM, 2014).

Este parámetro se estimó considerando la dispersión de los datos individuales con respecto a la media y se expresó en términos de coeficiente de variación (CV). En la **Tabla 5.9** se observa que el coeficiente de variación obtenido fue menor al 2.0%, para ambos compuestos, en los tres niveles de concentración evaluados. Por lo tanto, el sistema es preciso.

Tabla 5.9 Precisión del sistema para la cuantificación de furosemida y ketoprofeno

No. muestra	Área (mUA)					
	Furosemida			Ketoprofeno		
	Muestra control baja 10 μ M	Muestra control media 60 μ M	Muestra control alta 130 μ M	Muestra control baja 10 μ M	Muestra control media 60 μ M	Muestra control alta 130 μ M
1	267085	1756886	3610619	235035	1551799	3344281
2	259961	1726682	3608364	228566	1521345	3383589
3	256192	1750101	3646836	227386	1507597	3344766
4	264475	1743047	3583862	224444	1538045	3393701
5	258594	1711980	3613131	223438	1532063	3280551
Promedio	259879.2	1737739.2	3612562.4	227773.8	1530169.8	3349377.6
S	2700.45029	16330.2471	20100.3447	4083.86397	14972.1987	39797.8058
CV (%)	1.04	0.94	0.56	1.79	0.97	1.19

5.2.3 Validación del método

La validación del método se realizó de acuerdo con la revisión número 1 de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA en el 2015. A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros de desempeño evaluados.

5.2.3.2 Linealidad del método

El intervalo de concentraciones en el que se evaluó la linealidad se estableció con base en la concentración máxima evaluada o esperada en los estudios de permeabilidad y la concentración mínima cuantificable en el equipo cromatográfico de manera exacta y precisa. Los resultados obtenidos indican que la respuesta para cada compuesto es directamente proporcional a su concentración. En las **Tablas 5.10-5.12** se resumen los valores estimados del intercepto y de la pendiente, así como los intervalos de confianza obtenidos para cada uno.

Tabla 5.10. Parámetros estadísticos de la regresión lineal del método

Parámetros estadísticos	Furosemida	Ketoprofeno
Ordenada al origen (β_0)	2118.1	-668.49
Pendiente de la recta (β_1)	20790	18491
Coefficiente de correlación (r)	0.9995	0.9994
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9991	0.9988

Tabla 5.11 Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método de furosemida

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Ordenada al origen (β_0)	2118.099675	6295.936561	0.336423287	0.737765874	-10484.58662	14720.78597
Pendiente de la recta (β_1)	20790.16986	83.29514324	249.5964237	1.27766E-89	20623.43652	20956.90321

Tabla 5.12 Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método de ketoprofeno

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Ordenada al origen (β_0)	-622.3075125	6250.28824	-0.09956461	0.921039341	-13138.29382	11893.6788
Pendiente de la recta (β_1)	18490.68272	81.99934739	225.4979254	8.35169E-86	18326.48186	18654.88358

Tabla 5.13. Análisis de varianza con carencia de ajuste de furosemida

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Modelo	1	7.01434E13	7.01434E13	62298.37	1.27766E-89
Residuo	58	6.53037E10	1.12593E9		
Carencia de Ajuste	8	4.1482E10	5.18524E9		
Error Puro	50	2.38218E10	4.76436E8		
Total (Corr.)	59	7.02087E13			

Tabla 5.14. Análisis de varianza ketoprofeno

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	5.44769E+13	5.44769E+13	50849.31435	8.35169E-86
Residuos	57	61066336429	1071339236		
Total	58	5.45379E+13			

El análisis de los datos mediante una regresión lineal permitió estimar un coeficiente de correlación mayor a 0.999 para ambos fármacos, indicando una relación fuerte entre las variables. Asimismo, el análisis de varianza de cada modelo (**Tablas 5.13 y 5.14**), permitió calcular un valor P menor a 0.05 en ambos casos corroborando, con ello, que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área y la concentración. Finalmente, los coeficientes de determinación resultantes de los análisis estadísticos indican que más del 99.9% de la variabilidad obtenida en la respuesta está explicada por el modelo de linealidad ajustado para furosemida y ketoprofeno. Por lo tanto, el modelo de regresión lineal es adecuado para la aplicación que se pretende.

5.2.3.3 Precisión y Exactitud

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de la concentración del analito en la matriz enriquecida obtenida experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro incluidos en la **Tabla 5.15**. Los resultados obtenidos para ambos compuestos se encuentran dentro de los límites establecidos, por lo que, el método es exacto para el intervalo de concentraciones establecidas.

La precisión del método fue evaluada a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. En la **Tabla 5.15** se resumen los valores de los coeficientes de variación calculados para el análisis de las muestras en cada nivel de concentración. En todos los casos, el coeficiente de variación obtenido fue menor al 3.0 %. Por consiguiente, la variación obtenida está dentro del límite establecido por la Guía de Validación, el cual debe ser menor o igual al 15 %. Asimismo, la variación obtenida en diferentes días y con diferentes analistas (precisión

intermedia), en cada nivel de concentración, es menor que el límite especificado (**Tablas 5.16 y 5.17**).

Tabla 5.15 Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y la exactitud del método para cuantificar furosemida y ketoprofeno.

No. muestra	Concentración Recuperada (μM)					
	Furosemida			Ketoprofeno		
	Muestra control baja 10 μM	Muestra control media 60 μM	Muestra control alta 130 μM	Muestra control baja 10 μM	Muestra control media 60 μM	Muestra control alta 130 μM
1	10.22	59.40	130.23	10.05	60.61	126.08
2	10.38	59.81	130.61	10.32	59.84	129.51
3	10.18	59.80	130.17	10.32	59.56	129.50
4	10.02	60.29	130.66	10.09	60.94	128.05
5	9.94	60.59	130.37	9.96	59.22	130.22
Promedio	10.15	59.98	130.41	10.15	60.03	128.67
S	0.15	0.42	0.20	0.15	0.65	1.48
CV (%)	1.51	0.69	0.15	1.44	1.08	1.15
Exactitud (%)	101.48	99.96	100.32	101.49	100.06	98.98
Diferencia respecto al valor nominal	1.48	0.04	0.32	1.49	0.06	1.02

Tabla 5.16 Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar furosemida

Concentración (μM)	Concentración recuperada (μM)				\bar{X}	S	CV (%)
	Día 1		Día 2				
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2			
10	9.98	10.02	10.074	10.07	10.01	0.065	0.66
	10.06	9.99	10.04	10.00			
	10.14	10.04	10.06	9.95			
	10.05	9.92	9.93	10.06			
	10.14	10.03	10.08	9.89			
60	60.39	59.43	60.53	60.52	59.9	0.49	0.83
	59.89	59.57	60.41	59.93			
	59.30	60.10	60.00	59.94			
	60.13	60.02	60.79	59.76			
	61.11	60.08	58.95	59.84			
130	128.95	130.62	129.67	129.80	130.5	1.54	1.19
	132.16	130.725	1322.11	132.18			
	130.35	130.99	129.22	130.41			
	132.54	131.67	131.04	126.31			
	131.47	129.47	128.07	132.18			

Tabla 5.17 Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar ketoprofeno

Concentración (µM)	Concentración recuperada (µM)				\bar{X}	S	CV (%)
	Día 1		Día 2				
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2			
10	10.06	9.93	10.08	10.08	9.9	0.09	0.9
	10.00	9.70	10.02	9.96			
	10.04	9.92	10.06	9.92			
	9.94	10.0	9.94	10.10			
	9.89	9.90	10.11	9.95			
60	59.02	59.57	60.51	59.98	60.1	0.50	0.8
	59.96	59.77	60.35	59.85			
	60.98	59.82	60.39	60.52			
	59.96	60.42	60.87	59.53			
	60.84	60.62	59.60	59.91			
130	129.45	129.42	130.165	128.75	130.5	1.06	0.8
	128.86	130.32	129.68	130.84			
	130.58	130.41	130.65	131.06			
	129.44	130.98	131.173	131.21			
	130.43	128.81	133.42	131.10			

5.2.3.4 Recobro

En la **Tabla 5.18** se presentan los resultados obtenidos para evaluar el recobro del método para cuantificar furosemida y ketoprofeno en la matriz biológica, respectivamente. De acuerdo con los valores de los coeficientes de variación calculados, se observa, que el recobro es preciso y consistente para los dos fármacos. De esta manera, el conjunto de resultados descritos cumple con lo establecido en la guía emitida por la FDA.

Tabla 5.18 Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método de cuantificación de furosemida y ketoprofeno

Concentración (µM)	furosemida			ketoprofeno		
	\bar{X} X Área del analito en Fase Móvil (mUA)	\bar{X} Área del analito en HBSS (mUA)	\bar{X} Recobro Absoluto (%)	\bar{X} Área del analito en Fase Móvil (mUA)	\bar{X} Área del analito en HBSS (mUA)	\bar{X} Recobro Absoluto (%)
10	241735.4	245311	101.48	216997.4	220221.2	101.49
60	1387446.8	1386941.6	99.96	1278243.6	1278963.4	100.06
130	2759958.6	2768672.6	100.32	2939777.8	2909772.2	98.98
\bar{X}			100.59			100.17
S			0.647595158			1.026563827
CV			0.64			1.02

5.2.3.5 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 (FEUM, 2014). La concentración mínima a la cual fue posible cuantificar furosemida y ketoprofeno de manera reproducible y exacta fue de 1 µM para cada fármaco. En la **Tabla 5.19** se sintetizan los resultados obtenidos para evaluar la precisión y la exactitud de las soluciones preparadas para cada analito en esta concentración. Para los dos fármacos, la

variación obtenida fue menor al 15 % y la desviación de la media de la concentración recuperada respecto a su valor nominal también es menor al 15 %. Por lo tanto, los resultados cumplen con los requerimientos especificados en la guía de validación para establecer esta concentración como límite de cuantificación.

Tabla 5.19 Precisión y exactitud del límite inferior de cuantificación del furosemida y ketoprofeno

No. muestra	Concentración Recuperada (μM)	
	Furosemida 1 μM	Ketoprofeno 1 μM
1	0.995310958	1.009951331
2	1.000164528	0.992686044
3	0.993747943	0.995314355
4	0.999383021	1.004060288
5	1.011393551	0.997987982
Promedio	1	1
S	0.006185403	0.006245196
CV (%)	0.618540309	0.624519602
Exactitud (%)	100	100
Diferencia absoluta respecto al Valor Real (%)	0.46	0.5

5.2.3.6 Estabilidad de la muestra

La estabilidad del analito se refiere a la capacidad de mantener inalterada su estructura química, en una matriz dada, bajo condiciones específicas de almacenamiento por un tiempo determinado (FDA, 2015).

La estabilidad se evaluó a corto y largo plazo, así como en ciclos de congelación y descongelación. En las **Tablas 5.20** y **5.21** se presentan los resultados generados para evaluar la estabilidad de los analitos en las diferentes condiciones. La media de la diferencia absoluta respecto al valor nominal para ambos compuestos se encuentra entre 0.14 % y 1.30 %. De acuerdo con la guía de validación de métodos bioanalíticos la muestra es estable si el porcentaje de variación es menor al 15 %. En consecuencia, se deduce que las muestras de furosemida y ketoprofeno son estables durante 24 h, a temperatura ambiente, después de 3 ciclos de congelación-descongelación y en congelación durante 30 días.

Tabla 5.20 Resultados de estabilidad para las muestras de furosemida

	Muestra control alta 130 μM		Muestra control media 60 μM		Muestra control baja 10 μM	
	Media Conc. recuperada \pm S (μM)	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada \pm S (μM)	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada \pm S (μM)	Diferencia respecto al VN (%)
Estabilidad 24h en automuestreador	130.58 \pm 0.61	0.45	60.12 \pm 0.48	0.20	9.98 \pm 0.06	0.20
Ciclo 1 Congelación-Descongelación	130.07 \pm 0.36	0.05	59.98 \pm 0.38	0.03	9.99 \pm 0.98	0.10
Ciclo 2 Congelación-Descongelación	131.01 \pm 1.09	0.78	59.57 \pm 0.14	0.72	9.98 \pm 0.04	0.20
Ciclo 3 Congelación-Descongelación	130.35 \pm 0.34	0.27	59.67 \pm 0.46	0.55	9.98 \pm 0.12	0.20
Estabilidad a largo plazo	128.66 \pm 1.03	1.03	59.27 \pm 0.34	1.22	9.98 \pm 0.088	0.20

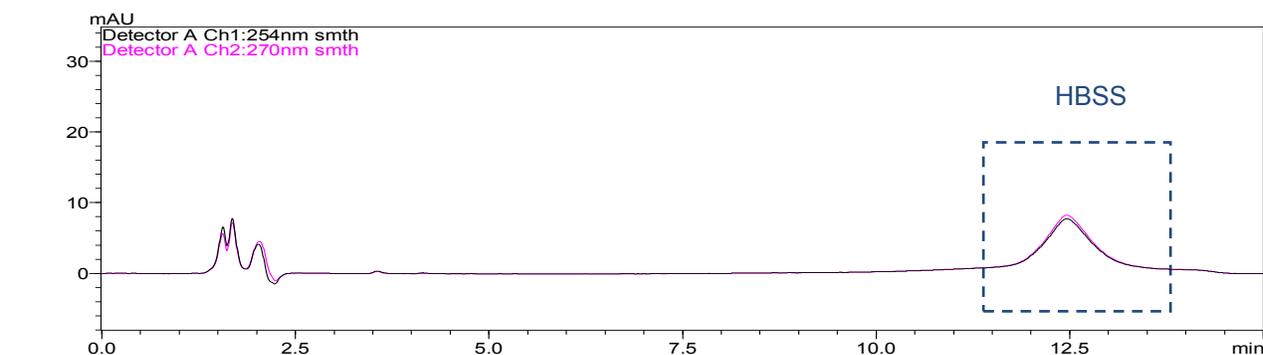
Tabla 5.21 Resultados de estabilidad para las muestras de ketoprofeno

	130 μM		60 μM		10 μM	
	Media Conc. recuperada \pm S (μM)	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada \pm S (μM)	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada \pm S (μM)	Diferencia respecto al VN (%)
Estabilidad 24h en automuestreador	130.59 \pm 0.20	0.45	60.21 \pm 0.49	0.35	9.97 \pm 99.74	0.30
Ciclo 1 Congelación-Descongelación	130.26 \pm 0.37	0.20	59.78 \pm 0.32	0.37	9.92 \pm 0.36	0.80
Ciclo 2 Congelación-Descongelación	130.94 \pm 0.62	0.72	59.79 \pm 0.28	0.35	9.87 \pm 0.17	1.30
Ciclo 3 Congelación-Descongelación	129.82 \pm 0.09	0.14	59.55 \pm 0.20	0.75	9.93 \pm 0.24	0.70
Estabilidad a largo plazo	129.18 \pm 0.18	0.63	60.27 \pm 0.42	0.45	9.90 \pm 0.36	1.0

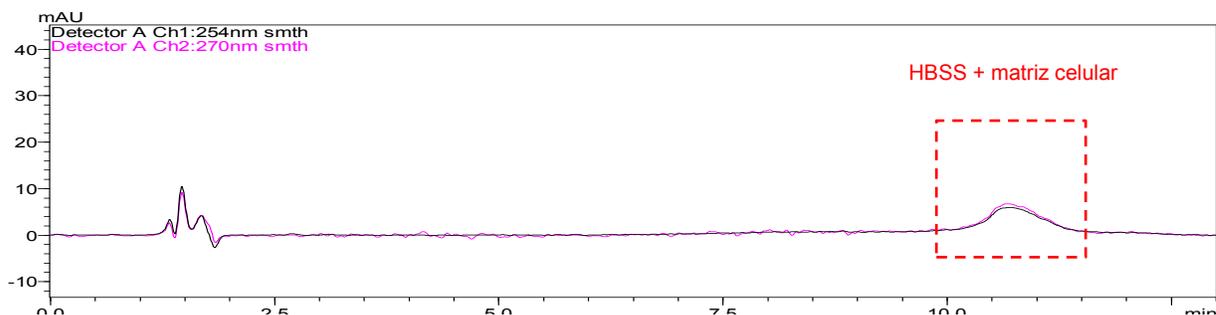
5.2.3.1 Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros compuestos contenidos en la muestra. Entre las sustancias que pueden interferir en una matriz biológica se encuentran los componentes endógenos de la matriz y los productos de degradación, por tan solo mencionar algunos (FDA, 2015).

En la **Figura 5.2** se ilustra los cromatogramas obtenidos con la solución amortiguadora de Hank (**a**), la matriz de la muestra, es decir, la solución amortiguadora de Hank en contacto directo con la monocapa celular formada en las placas Transwell (**b**) y furosemida y ketoprofeno a una concentración de 100 μM (**c**). Como se observa en los cromatogramas las señales debidas a los diluyentes y a la matriz celular no interfieren con las señales generadas por el furosemida y el ketoprofeno. Por lo tanto, la respuesta medida en este método se debe únicamente a los analitos de interés.



(a)



(b)

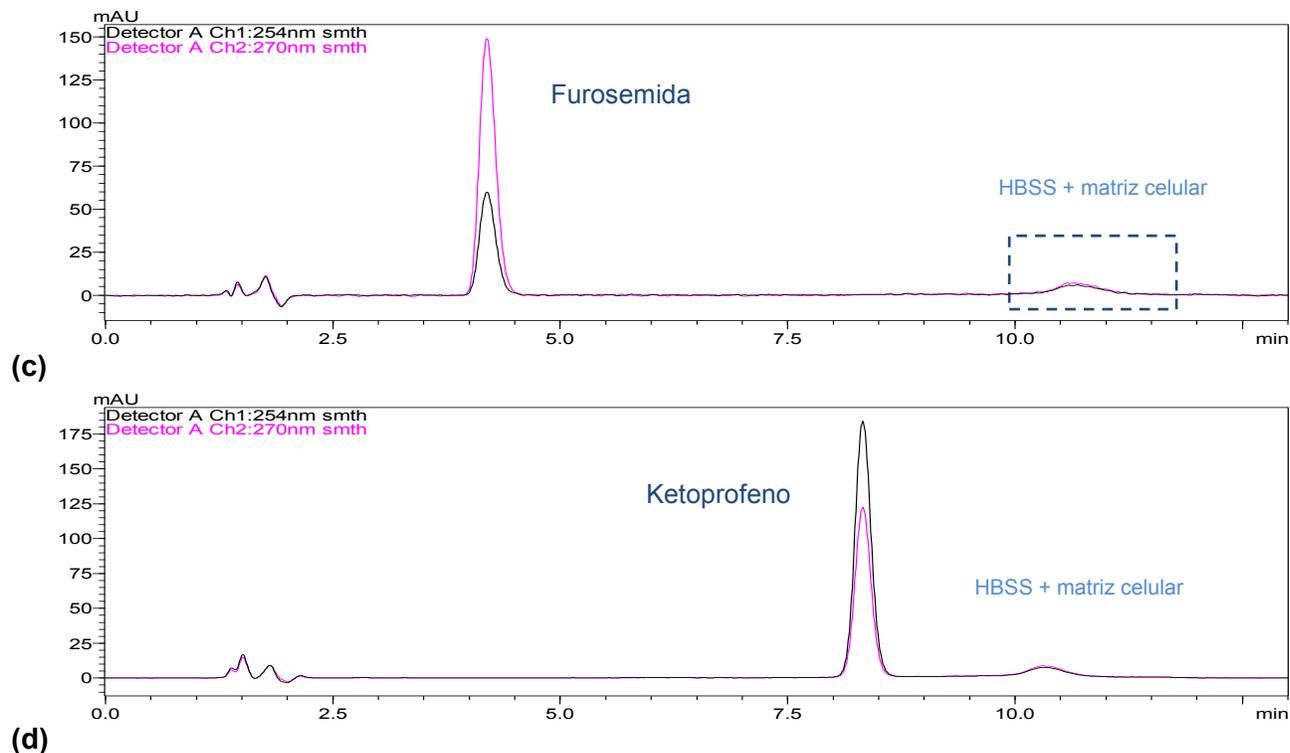


Figura 5.2 Cromatogramas obtenidos para evaluar la selectividad del método para cuantificar furosemida y ketoprofeno. HBSS (a), HBSS en contacto con la monocapa celular Caco-2 (b), furosemida a una concentración de 100 μ M (c), ketoprofeno a una concentración de 100 μ M (d)

4.2. Método bioanalítico para la cuantificación de 5-O-(β -D-apiofuranosil-(1-6)- β -D-glucopiranosil)-7-metoxi-3, 4'- dihidroxi-4 fenilcumarina presente en las infusiones de la corteza de *Hintonia standleyana* y de las hojas de *Hintonia latiflora*

4.2.1.6 Diseño de experimentos

Para evaluar este parámetro se empleó un diseño factorial 2^3 . Los factores evaluados fueron: la concentración de ácido trifluoroacético (A), la proporción de CH_3CN en la fase móvil (B) y el flujo (C) para ambas infusiones sobre la resolución de la señal correspondiente a **1**. Cada factor se evaluó en dos niveles, permitiendo ocho combinaciones posibles.

Para calcular el modelo factorial se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV. El análisis estadístico del modelo permitió establecer que la proporción de ácido y la interacción BC tienen un efecto significativo (95.0% de nivel de confianza) en la resolución debido a que su valor P es menor a 0.05. En contraste, las interacciones AB y AC no presentan un efecto significativo en la resolución de las señales. De acuerdo con la gráfica de contornos de superficie de respuesta estimada se deduce que la mayor resolución se obtiene empleando un volumen de inyección de 20 μ L, 0.1% de ácido trifluoroacético en la fase móvil y un flujo de 0.6 mL/min. Finalmente, el modelo no presenta datos atípicos y puede ser empleado con fines de estimación y predicción de la respuesta.

5.3.2 Evaluación del sistema

5.3.2.1 Precisión

Se determinó la precisión del sistema, para cada infusión, en tres niveles de concentración: alto, medio y bajo. Los resultados obtenidos se sintetizan en la **Tabla 5.22**.

Tabla 5.22 Precisión del sistema para cuantificar (1) en las infusiones de trabajo

No. muestra	Área (mUA)					
	<i>Hintonia standleyana</i>			<i>Hintonia latiflora</i>		
	Muestra control baja 12.5 µM	Muestra control media 27.5 µM	Muestra control alta 42.5 µM	Muestra control baja 12.5 µM	Muestra control media 27.5 µM	Muestra control alta 42.5 µM
1	303539	636588	986965	276999	628221	1009558
2	299335	645044	1001430	289655	629449	990935
3	301691	632801	982083	287259	626947	990069
4	297871	645115	985667	280796	622166	1003919
5	298854	640699	999252	286947	618461	1003986
Promedio	300258	640049.4	991079.4	284331.2	625048.8	999693.4
S	2172.3	5362.4	7375.5	4690.8	4116.7	7783.714913
CV (%)	0.7	0.8	0.7	1.6	0.7	0.8

5.3.2.2 Linealidad

En las **Tablas 5.23** y **5.24** resumen los valores estimados del intercepto y de la pendiente de la ecuación que describe a ambos modelos con sus respectivos intervalos de confianza. Esta aseveración se confirma con el análisis de varianza de cada modelo de regresión lineal en donde los valores estadísticos P son menores que el error ($\alpha=5\%$), indicando que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre las variables. Asimismo, los coeficientes de determinación calculados permiten concluir que más del 99% de la variabilidad en los datos, en ambas infusiones, está explicada por los modelos lineales estimados.

Tabla 5.23 Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para cuantificar (1) en la infusión de *H. standleyana*

Tabla 5.24 Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para cuantificar (1) en la infusión de *H. latiflora*

Parámetro	Mínimos Cuadrados Estándar		Prueba t	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	Coficientes	Error típico	Estadístico t_0	Valor-P	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-4816.89	4666.15	-1.0323	0.3108	-14375.076	4741.29405
Pendiente de la recta (β_1)	23598.4	150.036	157.285	8.3335E-43	23291.0312	23905.7007

Parámetro	Mínimos Cuadrados Estándar		Prueba t	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	Coficientes	Error típico	Estadístico t_0	Valor-P	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-10956.2	3620.88	-3.02584	0.00585557	0.153289	0.82217389
Pendiente de la recta (β_1)	23564.5	116.566	202.156	8.237E-44	4.1947E-05	4.2858E-05

Con base en la información presentada el sistema es lineal y presenta buena precisión para cuantificar el marcador (1) en ambas infusiones.

5.3.3 Validación del Método

El método se validó de manera independiente para cada infusión siguiendo el mismo documento mencionado en el numeral **5.2.3** y evaluando los mismos parámetros de desempeño.

5.3.3.1 Linealidad del método

El intervalo de concentraciones evaluado en este parámetro de desempeño se estableció con base en la concentración mínima cuantificable de manera precisa y exacta, y la concentración máxima de (1) presente en las infusiones de *Hintonia standleyana* y *Hintonia latiflora*. El análisis estadístico de los datos permitió estimar los siguientes modelos:

Ecuación que describe al modelo para la infusión de *H. standleyana*: Área = 345002.2 + 20817.3 * Concentración
 Coeficiente de correlación (r) = 0.9991

Coeficiente de determinación (r²) = 99.83%

Ecuación que describe al modelo para la infusión de *H. latiflora*: Área = 1613.2 + 23440.8 * Concentración

Coeficiente de correlación (r) = 0.9990

Coeficiente de determinación (r²) = 99.81%

Finalmente, el análisis de varianza de la regresión permitió establecer que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área y la concentración.

5.3.3.2 Precisión y Exactitud

De nueva cuenta, la precisión se evaluó a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. Los coeficientes de variación calculados son menores al 1.4% en los tres niveles de concentración que se evaluaron. Con base en estos resultados se deduce que el método desarrollado es repetible.

Por otro lado, la precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de muestras preparadas por dos analistas en dos días diferentes. Los resultados obtenidos permiten concluir que, cuando se aplica el método en diferentes días y por distintos analistas, la variabilidad generada es menor al 15%.

Finalmente, los porcentajes de exactitud se encuentran dentro del intervalo del rango de 98.0-104.0%. La diferencia absoluta obtenida al comparar la concentración recuperada con la concentración nominal, en todos los niveles de concentración, es menor al 15% para ambas infusiones. Consiguientemente, el método es exacto para cuantificar (1) en *Hintonia standleyana* y *Hintonia latiflora* en la matriz biológica.

5.3.3.3 Recobro

El recobro de (1), para cada infusión, en los tres niveles de concentración evaluados fue cercano al 100% (Tabla 5.25). Los coeficientes de variación calculados a partir del porcentaje de recobro en cada nivel de concentración fueron menores al 0.6 % en todos los casos, por lo que se puede establecer que los porcentajes fueron consistentes en todos los niveles de concentración.

Tabla 5.25 Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método

Concentración (µM)	<i>Hintonia standleyana</i>			<i>Hintonia latiflora</i>		
	\bar{X} Área del analito en Fase Móvil (mUA)	\bar{X} Área del analito en HBSS (mUA)	\bar{X} Recobro Absoluto (%)	\bar{X} Área del analito en Fase Móvil (mUA)	\bar{X} Área del analito en HBSS (mUA)	\bar{X} Recobro Absoluto (%)
42.5	861175.0	859877.8	99.8	1084964.3	1083010.40	99.8
27.5	561346.0	553070.8	101.0	578769.7	580896.8	100.4
12.5	266353.3	265579.5	99.7	266388.0	264746.20	99.4
			100.2			99.9
			0.6			0.40
			0.6			0.4 %

5.3.3.4 Límite de cuantificación

El valor de límite de cuantificación calculado corresponde a una concentración de 7 y 8 µM para las infusiones de *Hintonia latiflora* y *Hintonia standleyana* respectivamente.

5.3.3.5 Estabilidad de la muestra

Los resultados obtenidos para este parámetro permiten concluir que las muestras de ambas infusiones son estables: a temperatura ambiente durante 24 h, después de 3 ciclos de congelación-descongelación y en congelación durante 1 mes.

5.4 Cultivo celular

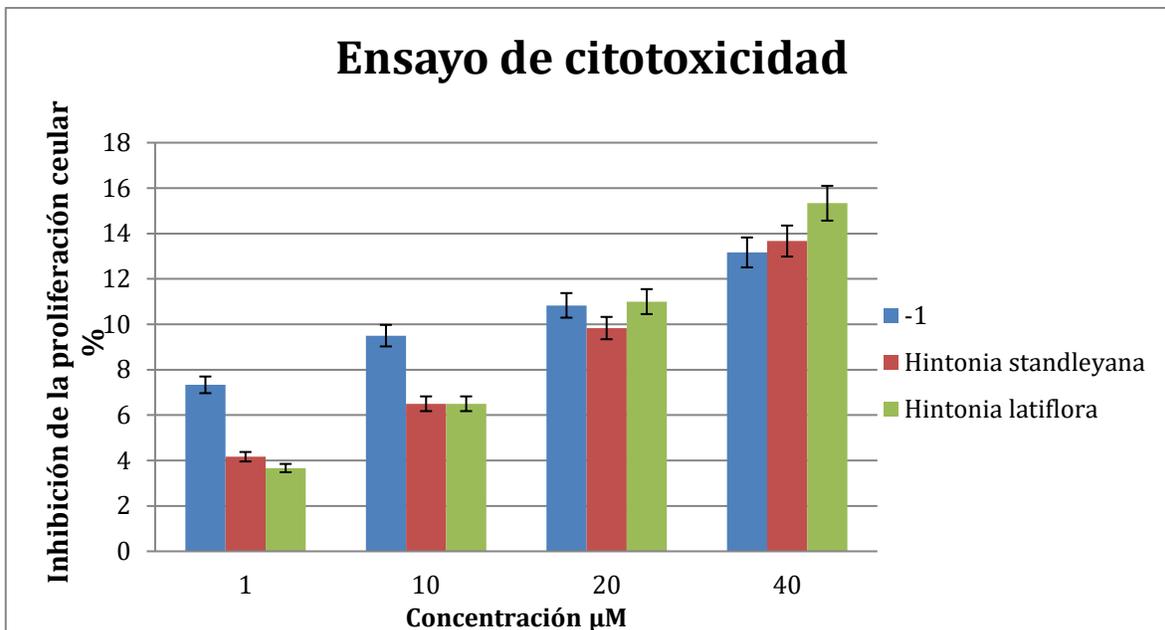
El banco celular maestro se formó con 47 crioviales, conteniendo, cada uno de ellos, de 1 a 1.5×10^6 células entre los pases 3 al 11. Cada criovial se formó a partir de la proliferación de las células adquiridas en la ATCC® (lote 61777384) siguiendo las condiciones de cultivo mencionadas en el inciso 4.4.2. Una vez que el cultivo llegó a confluencia se realizó la disociación de las células y se criopreservaron para formar el banco celular maestro. A partir de este banco se proliferó la línea celular para formar el banco celular de trabajo con el que se realizaron los ensayos de citotoxicidad y de permeabilidad.

5.5 Ensayo de citotoxicidad

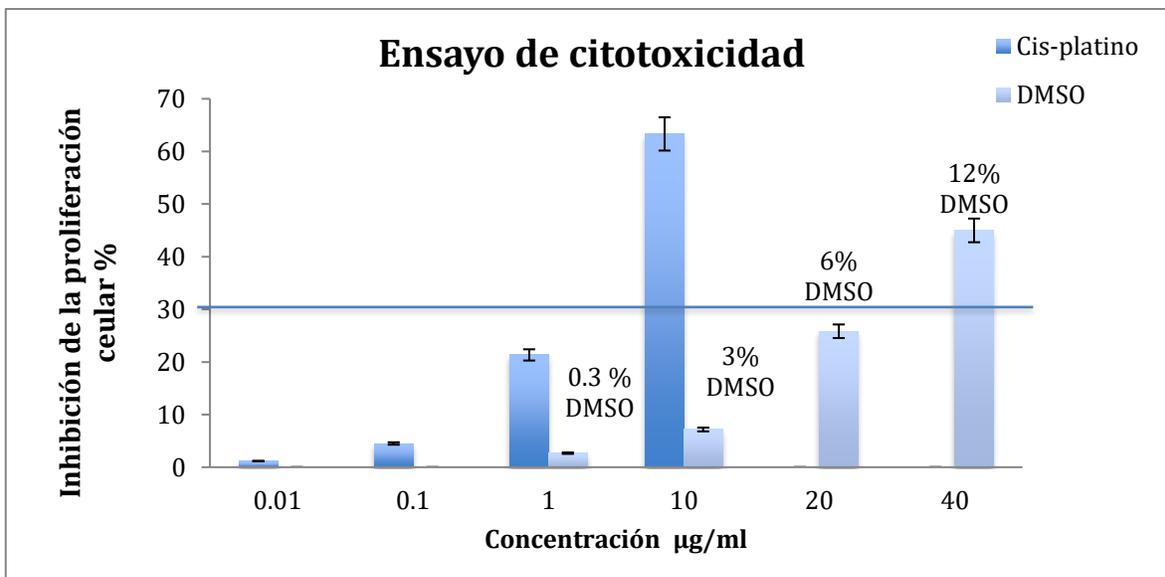
Es importante determinar la citotoxicidad de los compuestos y los cosolventes utilizados en los estudios de permeabilidad con el objetivo de aumentar la seguridad en los resultados obtenidos de los experimentos *in vitro*; ya que el obtener valores considerados como de alta permeabilidad pueden deberse a la muerte de células y a la subsecuente pérdida de la integridad de la monocapa celular (Adams *et al.*, 2003).

En la **Gráfica 5.1 y 5.2** se presentan los resultados obtenidos para evaluar la citotoxicidad de los compuestos y de los cosolventes mediante la técnica de tinción con sulforrodamina. En las gráficas se representa el porcentaje de viabilidad celular obtenido en cada caso y la desviación estándar correspondiente a las infusiones (6 réplicas), cis-platino (4 réplicas) y DMSO (2 réplicas). De acuerdo con la Guía ISO 10993-5 la reducción de un 30% o más en la viabilidad celular se considera como efecto citotóxico; por lo tanto, se tomó este valor como referencia para determinar la citotoxicidad de las sustancias evaluadas.

Los resultados obtenidos indican que las infusiones de *Hintonia standleyana* y *Hintonia latiflora*, así como el compuesto (1) a una concentración máxima de 50 μM no dañan la integridad de la monocapa durante los estudios de permeabilidad. Este parámetro se verifica de nueva cuenta mediante la medida de la resistencia transepitelial (TEER).



Gráfica 5.10 Viabilidad de las células Caco-2 frente a las infusiones de *H. latiflora*, *H. standleyana* y el compuesto (1) con un tiempo de exposición de 24 h



Gráfica 5.11 Viabilidad de las células Caco-2 frente a cis-platino y DMSO (Controles positivos) con un tiempo de exposición de 24 h.

*El control positivo empleado fue DMSO al 30% en medio de disolución

**Las barras de error representan la desviación estándar de cada resultado.

6. CONCLUSIONES

Se desarrollaron tres métodos bioanalíticos por HPLC; uno para cuantificar furosemida y ketoprofeno, y otros dos para cuantificar el marcador (1) en las infusiones de *Hintonia standleyana* e *Hintonia latiflora* para estudios de transporte a través de la monocapa celular Caco-2.

El método demostró ser exacto, preciso, lineal y selectivo para cuantificar cada uno de los marcadores de permeabilidad (furosemida y ketoprofeno) en un intervalo de concentraciones de 1 a 50 μM .

Los métodos para cuantificar (1) en las infusiones de trabajo demostraron ser exactos, precisos y lineales en el intervalo de *concentraciones establecido* (7 a 50 μM y 8 a 50 μM , respectivamente). Asimismo, el recobro obtenido de las muestras con la matriz biológica fue consistente en los niveles de concentración evaluados.

Por último, se encontró que las muestras de los marcadores de permeabilidad y de las infusiones fueron estables a corto y largo plazo y en 3 ciclos de congelación-descongelación.

Las infusiones de *Hintonia standleyana* e *Hintonia latiflora* no presentaron efecto citotóxico sobre la línea celular Caco-2, al igual que el producto puro (1) en un intervalo de concentraciones de 1 a 40 μM .

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, D., *et al.* (2003). *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 1266-1272.
2. Anaya D. (1991). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
3. Argueta, A. V., *et al* (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*, Instituto Nacional Indigenista. México, D.F. 1786.
4. Argueta, A. V., Cano. L.M y Rodarte, M.E. [editores] (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*, Instituto Nacional Indigenista. México, D.F. 1786
5. Borhidi, A. (2006). Akadémiai Kiadó. Budapest. 512.
6. Bye, R. 1986. *Economic Botany*. 40, 103-124.
7. Cristians, S. (2009). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
8. Cristians, S., *et al* (2009). *Journal of Natural Products*, 72, 408-413.
9. Cao., *et al.*(2008). Drug absorption principles. En Krishna, R. y Yu, L. Biopharmaceutics application in drug development. Springer. USA. 75- 100.
10. Díaz, J.L. (editor). 1976. *Usos de las plantas medicinales de México: monografías científicas I y II*. Instituto mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. México, D.F 358 y 329
11. 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.
12. Food and Drug Administration (2015). Bioanalytical Method Validation.
13. Gentry, H.S. Institution of Washington. Washington, D.C. (1942). 329
14. Gonzáles- Chávez., *et al.* (2000). *Serie Patrimonio vivo 5. México: actores Sociales de la Flora Medicinal en México*. 5, 27-28
15. Guerrero-Analco, *et al.* (2007). *Phytochemistry*, 68, 2087-2095.
16. International Conference on Harmonisation (2005). Validation of analytical procedures. Text and Methodology Q2 (R1). ISO-International Organization for Standardization (2009). ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices, part 5: testes for *in vitro* cytotoxicity. 3rd edition.
17. Linares, E., *et al.* (1987). *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 153-83.
18. Martínez, A. (2017). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
19. Martínez, M. *Las plantas medicinales de México*. Ed Botas. México D.F, (1989), 656.
20. Mociño, J. M. (1802). *Anales de Historia Nacional 1799-1804*. III: 288-296
21. Monks, A., *et al* (1991). *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757-766.
22. Monroy, O., *et al.* (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. 2ª ed. Editorial UAEM. Cuernavaca. 405
23. Sahagún, B. (1540-1585). *Historia general de las cosas de Nueva España. Primera versión integral del texto castellano del manuscrito conocido como Códice Florentino*. Introducción, Peleografía, glosario y notas de Alfredo López Austin y Josefina García Quintana. 2 vols. Alianza Editorial Quinto Centenario. Madrid, 1988.
24. Schlaepfer, L., *et al* (2010). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41 (4): 18-27.
25. Skehan., *et al.* (1990). *Journal of the National Cancer Institute* 82 (13) 1107-1112

