



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

“DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC  
PARA LA DETERMINACIÓN DE UN NUEVO ANÁLOGO DE  
ANFOTERICINA EN PLASMA”

**TESIS.**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA  
JOSÉ LUIS IBARRA AVIÑA.



CIUDAD DE MÉXICO

ENERO 2019



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. Helgi Helene Jung Cook.  
VOCAL: M. en C. Juan Manuel Rodríguez.  
SECRETARIO: Dra. Nelly Norma Castro Torres.  
1er. SUPLENTE: M. en C. Kenneth Rubio Carrasco.  
2do. SUPLENTE: M. en C. María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz

## SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

## ASESOR DEL TEMA:

---

Helgi Helene Jung Cook.

SUPERVISOR TÉCNICO

---

María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz.

SUSTENTANTE.

---

José Luis Ibarra Aviña



---

## LISTA DE ABREVIATURAS.

AmB	Anfotericina B
AmBD	Anfotericina B Desoxicolato
AmBL	Anfotericina B Liposomal
AmBCL	Anfotericina B Complejo lipídico.
A-21	Análogo de Anfotericina B
ACN	Acetonitrilo
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
nm	Nanometro
ng	nanogramos
ppb	Partes por billón
$\mu\text{m}$	Micrometro
mm	Milimetro
M	Molar
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
OMS	Organización Mundial de la Salud
%V/V	Porcentaje volumen/ volumen
min	Minuto
mL	Mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\lambda$	Longitud de onda
MeOH	Metanol
rpm	Revoluciones por minuto
FM	Fase móvil
FDA	Food and Drug Administration
OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
Kg	Kilogramo
mg	miligramo
g	gramo
h	hora
DL50	Dosis letal 50
%DRC	% Desviación de la concentración recuperada.
Cmax	Concentración máxima
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celcius
NOM	Norma Oficial Mexicana
ABC	Área bajo la curva
Cl	Aclaramiento del fármaco



Vd	Volumen de distribución
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
TCA	Ácido tricloroacético
PEG	Polietilenglicol



## Índice general

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
3.1 Desarrollo de nuevos medicamentos.....	12
3.1.1 Situación actual del desarrollo y la investigación de nuevas moléculas antimicrobianas. (DINMA) .....	14
3.2 Anfotericina B.....	16
3.2.1 Mecanismo de acción de la Anfotericina B.....	17
3.2.2 Espectro e indicaciones terapéuticas de AmB <sup>9</sup> .....	18
3.2.3. Reacciones adversas, interacciones y contraindicaciones del uso de AmB .....	19
3.2.4. Propiedades fisicoquímicas de AmB.....	19
3.2.5. Farmacocinética de AmB .....	20
3.2.6. Métodos de cuantificación por CLAR de AmB.....	21
3.3 Análogos de AmB .....	22
3.4 Análogo de AmB: A-21 .....	22
3.5 Desarrollo de métodos analíticos .....	23
3.6 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) .....	24
3.6.1 El proceso cromatográfico.....	24
3.6.2 Tipos de cromatografía.....	25
3.6.2.1 Cromatografía de reparto.....	25
3.6.2.2 Cromatografía de adsorción.....	25
3.6.2.3 Cromatografía de exclusión molecular .....	26
3.6.2.4 Cromatografía de intercambio iónico .....	26
3.6.2.5 Cromatografía de Bio-afinidad .....	26
3.6.3 Instrumentación en CLAR .....	27
3.6.3.1 Bomba.....	27
3.6.3.2 Sistemas de inyección.....	28
3.6.3.3 Columna cromatográfica.....	28
3.6.3.3.1 Precolumnas .....	28
3.6.3.4 Detector .....	29
3.7 Preparación de muestras para extraer un fármaco de una matriz biológica	29



3.7.1	Método de extracción líquido-líquido.....	30
3.7.2	Método de extracción Sólido-Líquido .....	30
3.7.3	Precipitación de proteínas.....	31
3.7.3.1	Métodos de precipitación de proteínas:.....	31
3.7.3.2	Agentes precipitantes de proteínas.....	32
<b>4.</b>	<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>33</b>
4.1	Materiales, reactivos, instrumentos, equipos .....	33
4.1.1	Materiales.....	33
4.1.2.	Reactivos .....	33
4.1.3.	Intrumentos y equipos.....	34
4.2	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES .....	35
4.3	Desarrollo de la metodología .....	41
4.3.1	Elección de la técnica analítica para la cuantificación de A-21 en plasma .....	41
4.3.1.1	Selección de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de análisis .....	41
4.3.1.2	Selección de la columna cromatográfica.....	41
4.3.1.3.	Selección de la fase móvil. (F.M.).....	42
4.3.1.3.1.	Proporciones del disolvente orgánico: fase acuosa.....	42
4.3.1.3.2.	Influencia del pH.....	42
4.3.1.3.3.	Influencia presencia de sales en la fase acuosa .....	43
4.3.1.4.	Selección del volumen de inyección .....	43
4.3.1.5.	Selección de velocidad del flujo.....	43
4.3.1.6.	Curva de calibración en solución.....	44
4.3.2.	Selección de las condiciones de extracción.....	44
4.3.2.1	Método de extracción líquido-líquido.....	44
4.3.2.1.1	Pruebas de solubilidad de A-21 .....	44
4.3.2.1.2.	Pruebas de extracción líquido-líquido.....	45
4.3.2.1	Precipitación de proteínas.....	46
4.3.2.1.1	Prueba de precipitación de proteínas empleando diferentes agentes precipitantes .....	46
4.3.3.	Evaluación del desempeño del método .....	46
4.3.3.1	Selectividad .....	46
4.3.3.2	Linealidad.....	47
4.3.3.3	Precisión .....	47



---

4.3.3.3.1 Repetibilidad .....	47
4.3.3.3.2 Reproducibilidad.....	47
4.3.3.4 Exactitud .....	48
4.3.3.5. Recobro.....	48
4.4 Diagrama de pruebas a realizar. ....	49
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
5.1 Selección de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de análisis .....	50
5.2 Selección de la columna cromatográfica.....	51
5.3 Selección de la fase móvil .....	52
5.3.1 Selección de la proporción Acetonitrilo: Agua.....	52
5.3.2 Selección del pH .....	52
5.3.3 Influencia de la presencia de sales en la fase acuosa .....	53
5.4 Selección del volumen de inyección .....	54
5.5 Selección de la velocidad de flujo .....	54
5.6 Resumen de condiciones cromatográficas seleccionadas para el método de cuantificación de A-21 .....	56
5.7 Linealidad del sistema .....	57
5.8 Evaluación del método de extracción líquido-líquido.....	58
5.8.1 Pruebas de solubilidad de A-21.....	58
5.8.2 Pruebas de extracción líquido-líquido con Acetato de etilo .....	59
5.9. Precipitación de proteínas .....	60
5.9.1 Pruebas de precipitación de proteínas con diversos agentes precipitantes .....	60
5.10. Evaluación del método.....	62
5.10.1. Selectividad .....	62
5.10.2 Linealidad del método.....	65
5.10.3 Precisión .....	67
5.10.3.1 Repetibilidad .....	67
5.10.3.2 Reproducibilidad.....	67
5.10.4 Exactitud .....	68
5.10.5 Determinación del % de recobro.....	69
<b>6.0 CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>7.0 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>



## Índice de tablas

Tabla 1: Etapas del desarrollo de un medicamento .....	13
Tabla 2 Nuevas moléculas antimicrobianas clasificadas de acuerdo con el blanco terapéutico en los periodos de 1998-2002 y 2015-2018 .....	15
Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de AmB. ....	19
Tabla 4 Parámetros farmacocinéticos de AmB .....	20
Tabla 5 Métodos de cuantificación por CLAR de AmB.....	21
Tabla 6 Agentes precipitantes de proteínas <sup>37</sup> .....	32
Tabla 7 Esquema de preparación de disoluciones para pruebas en solución.....	39
Tabla 8. Esquema de preparación de disoluciones para pruebas en plasma. ....	40
Tabla 9. Esquema de preparación de disoluciones para prueba de recobro, usando SA a pH 7.4 .....	40
Tabla 10 .Columnas cromatográficas evaluadas para el desarrollo del método. ..	41
Tabla 11. Proporciones de F.M. evaluadas.....	42
Tabla 12. Soluciones a diferentes pH evaluadas en la fase móvil.....	42
Tabla 13. Pruebas de extracción líquido-líquido.....	45
Tabla 14. Procedimientos aplicados para la evaluación del método de precipitación de proteínas para la extracción del compuesto A21.....	46
Tabla 15. $\lambda$ de absorción y absorbancia del barrido de A-21. ....	50
Tabla 16. Respuesta en las diferentes columnas cromatográficas evaluadas para A-21. ....	51
Tabla 17. Evaluación de distintas proporciones agua: acetonitrilo. ....	52
Tabla 18. Evaluación de distintos pH a concentración [0.05 M] .....	53
Tabla 19. Tiempo de retención de A-21 vs velocidad de flujo. ....	55
Tabla 20. Condiciones analíticas finales para la cuantificación de A-21 en plasma. ....	56
Tabla 21. Valores de área bajo la curva (ABC) mV de las tres curvas de calibración en sistema.....	57
Tabla 22. Solubilidad cualitativa de A-21 en disolventes inmiscibles en agua. ....	59
Tabla 23. Pruebas de extracción líquido- líquido con acetato de etilo.....	60
Tabla 24. Prueba de agentes precipitantes.....	61
Tabla 25. Respuestas analíticas por parte de la matriz biológica (humano, rata, ratón) cercanas al tiempo de retención de A-21 (Tr 2.21min) .....	62
Tabla 26. Resultados de ABC en curvas de calibración de A-21 en plasma.....	66
Tabla 27. Valores de regresión lineal en las curvas de calibración. ....	66
Tabla 28. Resultados para la prueba de exactitud. ....	67
Tabla 29. Resultados de la concentración recuperada de A-21 para la prueba de reproducibilidad.....	67
Tabla 30. Resultados %DCR.....	68
Tabla 31. Resultados de la prueba para la determinación del porcentaje de recobro .....	69



## Índice de figuras

Figura 1. Nuevos antimicrobianos de 1983-2002.....	14
Figura 2. Historia del desarrollo de antifúngicos. Tomada de Catalán M, 2006. ...	16
Figura 3. Estructura química de la Anfotericina B. ....	17
Figura 4. Mecanismo de acción de diferentes antifúngicos.....	18
Figura 5. Estructura química de A-21. Obtenido de Flores-Romero, 2016.....	23
Figura 6. Principio de la cromatografía de afinidad. ....	26
Figura 7. Esquema de instrumentos que componen el proceso cromatográfico... ..	27
Figura 8. Esquema de la extracción líquido-líquido.....	30
Figura 9. Barrido espectrofotométrico de A-21 [12.5µg/mL] en intervalo de 180nm-500nm. ....	50
Figura 10. Cromatogramas comparativos de la inyección de A-21 buffer de acetatos pH 5 vs disolución de ácido acético. ....	54
Figura 11. Modificación de velocidad de flujo en el intervalo de 0.6- 1.2 mL/min..	55
Figura 12. Inyección de A-21[2µg/mL] bajo las condiciones finales de análisis. ....	56
Figura 13. Curva de calibración promedio en sistema (n=3): Intervalo de concentraciones de 2-20 (µg/mL).....	58
Figura 14. Blanco de precipitación de proteínas plasma Humano. ....	63
Figura 15. Blanco de precipitación de proteínas de plasma de rata wistar. ....	63
Figura 16. Blanco de precipitación de proteínas de plasma de ratón ICR.....	63
Figura 17. A-21 en plasma humano en concentración de [2µg/mL] muestra tratada con el método de precipitación de proteínas. ....	64
Figura 18. A-21 en plasma humano en concentración de [20µg/mL] muestra tratada con el método de precipitación de proteínas. ....	64
Figura 19. Curva de calibración promedio de A-21 en plasma humano. (n=3). ....	66

## Índice de esquemas.

Esquema 1. Pruebas a realizar para el desarrollo del método analítico.....	49
Esquema 2. Tratamiento de muestras de plasma con el método de precipitación de proteínas. ....	65

## Índice de ecuaciones.

Ecuación 1. % Respuesta en plasma.....	47
Ecuación 2. % Desviación de la concentración recuperada. ....	48
Ecuación 3 % Recobro. ....	48



## 1. RESUMEN

En mayo del 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS), emite una alerta mundial por la resistencia a los antimicrobianos en donde señala el grave riesgo que tiene el que diversos microorganismos sean resistentes a los antimicrobianos de uso común y como parte de sus medidas preventivas invita a la industria farmacéutica al desarrollo de nuevos antimicrobianos, sin embargo, los mayores retos a considerar en el desarrollo farmacéutico son: la elevada toxicidad que puede presentar una nueva entidad farmacológica, así como el lograr la eficacia deseada, además de la gran inversión económica y el tiempo que conlleva el desarrollo de las mismas.

Con el objetivo de generar nuevas opciones antimicrobianas, el doctor Iván Ortega y sus colaboradores, han trabajado en la síntesis de un compuesto análogo a la Anfotericina B (AmB) al que denominaron A-21. Este compuesto ha mostrado hasta ahora, actividad antifúngica semejante a AmB, por lo que resulta de interés realizar estudios de farmacocinética y pruebas preclínicas bajo altos estándares de calidad y buenas prácticas de laboratorio para garantizar la seguridad de este compuesto. El presente trabajo, aporta una herramienta analítica en la investigación básica al desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), para la cuantificación de A-21 en plasma en el cuál se empleó un método de precipitación de proteínas con acetonitrilo en proporción 1:1 obteniendo un porcentaje de recobro mayor al 80%, este método demostró ser lineal, preciso, exacto y sensible de acuerdo a los parámetros establecidos por la NOM-177-SSA1-2013 en el rango 2  $\mu\text{g/mL}$ - 20  $\mu\text{g/mL}$ .



## 2. OBJETIVOS

- Objetivo general

Desarrollar un método analítico que, de acuerdo a lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013, demuestre selectividad, sensibilidad, linealidad, exactitud y precisión para poder cuantificar A-21 en plasma para estudios posteriores de farmacocinética en modelos animales.

- Objetivos particulares

Establecer las mejores condiciones cromatográficas, como son, columna cromatográfica, fase móvil, volumen de inyección, longitud de onda y velocidad de flujo.

Obtener valores de tiempo de retención, factor de simetría y pico cromatográfico con respuesta adecuada para demostrar un método selectivo, preciso y exacto.

Seleccionar el mejor proceso de preparación de las muestras con la matriz biológica en el cual el porcentaje de recobro sea mayor al 80%.



### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Desarrollo de nuevos medicamentos**

El proceso de desarrollo de nuevas moléculas consiste en una serie de estudios que tienen como objetivo el descubrimiento de nuevas opciones terapéuticas que demuestren ser eficaces y seguras contra diversas enfermedades.

Dicho proceso está dividido en etapas que están resumidas en la tabla 1, en la etapa de investigación básica es de gran importancia el definir la caracterización fisicoquímica de la nueva molécula, así como la síntesis a gran escala y los métodos analíticos para su identificación y cuantificación, además de que demuestre mediante el desarrollo farmacéutico que la molécula es candidata a ser una opción terapéutica evaluando su eficacia y seguridad. Lo que resulta de gran importancia es que todas estas etapas deben estar respaldadas por altos estándares de calidad que aseguren que este producto farmacéutico no representará un riesgo para el consumidor<sup>40</sup>, para esto cada etapa debe utilizar un sistema de gestión de calidad que respalde sus resultados, por ejemplo, en la fase preclínica se debe aplicar el concepto de buenas prácticas de laboratorio que se definen por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) como el sistema de garantía de calidad, relativo al modo de organización de los estudios de seguridad no clínicos referentes a la salud y al medio ambiente en materia de cómo se planifican, se ejecutan, se controlan, se registran, se archivan y se informan<sup>41</sup>; exige tener instalaciones adecuadas para realizar dicho estudio, personal con capacidad técnica demostrada y equipos calificados y verificados para asegurar el correcto funcionamiento, así como la operación bajo un sistema de gestión de la calidad reconocido o autorizado por alguna entidad regulatoria.

Respecto a las etapas de desarrollo, en la actualidad, como parte del nuevo Programa Marco de Investigación e Innovación (H2020)<sup>42</sup> se pretende adoptar además de la clasificación convencional, modelos de desarrollo tecnológico, como por ejemplo el de la NASA que se fundamenta en niveles de madurez de



la tecnología (TLR por sus siglas en inglés Technology Readiness Levels), que consta de 9 niveles que se aplican al desarrollo de nueva tecnología, estos niveles consisten básicamente en TLR1: idea básica, TLR2: Formulación, TLR3: Prueba de concepto, TLR4: Validación a nivel de componentes en laboratorio, TLR5: Validación de componentes a nivel de laboratorio en un entorno relevante, TLR6: Validación de sistema en un entorno relevante, TLR7: Validación de un sistema en entorno real, TLR8: Validación y certificación completa en un entorno real y TLR 9: Pruebas con éxito en un entorno real<sup>43</sup>. Se debe entender que con entorno relevante me refiero a las condiciones que se aproximen a la realidad, este modelo claramente puede implementarse al modelo convencional proporcionando una investigación confiable y bien fundamentada, en la tabla 1 hago la integración de los 9 TLRs en el modelo de desarrollo farmacéutico convencional, por ejemplo con entorno relevante se pueden aplicar las pruebas *In vitro* e *In vivo* que nos proporcionan información importante en la fase de investigación básica a nivel de componentes y preclínica a nivel de sistema; y con entorno real es aplicable a las pruebas con humanos. Es importante extrapolar la actual metodología de investigación a modelos sólidos que nos aseguren un producto tecnológico de alta calidad.

Tabla 1: Etapas del desarrollo de un medicamento<sup>41</sup>

Etapa	Fase	TLR aplicable a esta etapa	Modelo de estudio	Nº de participantes	Objetivos
Investigación básica	NA	1-4	<i>In vivo, In vitro</i>	Variable	Desarrollo farmacéutico (pruebas de, eficacia, toxicidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , selección de la forma farmacéutica, dosis, estabilidad), desarrollo químico (métodos analíticos, síntesis, caracterización fisicoquímica)
Preclínica	0	5-6	<i>In vivo, In vitro</i>	Variable	Estudios eficacia y de toxicidad (aguda, a dosis repetidas, genotoxicidad, teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad), farmacocinética.
Clínica	I	7	Voluntarios Sanos	20-80	Seguridad, farmacocinética y farmacodinamia.
	II	8	Enfermos	100-300	Eficacia y seguridad a corto plazo, selección del rango de dosis
	III		Enfermos	300-3000	Eficacia y seguridad comparativa
	IV	9	Enfermos	>1000	Farmacovigilancia, evaluación de eficacia y seguridad a largo plazo.



### 3.1.1 Situación actual del desarrollo y la investigación de nuevas moléculas antimicrobianas. (DINMA)

En la actualidad, el DINMA resulta un tema de gran interés a nivel mundial, debido a la emergencia que existe por los casos de multiresistencia de patógenos comunes, así como el surgimiento de nuevas enfermedades infecciosas, sin embargo, el reto para el desarrollo se debe a que, en principio, se estima que por cada molécula aprobada por FDA, se invierten entre \$400-\$800 millones de dolares<sup>1</sup>, de que los antibióticos que existen actualmente, difícilmente pueden ser desplazados por un antibiótico desarrollado recientemente y los efectos adversos generados por la elevada toxicidad de las nuevas moléculas.

En un estudio realizado por la FDA en el año 2004<sup>1</sup>, se muestra la tendencia a desarrollar nuevas moléculas recopilando información de 15 de las empresas farmacéuticas y 7 de las empresas de biotecnológicos más grandes del mundo desde 1983 hasta el 2002, prestando especial atención en el desarrollo de moléculas antimicrobianas, encontrando una notable disminución en el número de moléculas antimicrobianas aprobadas como se observa en la figura 1 tomada de este mismo artículo.



Figura 1. Nuevos antimicrobianos de 1983-2002. Obtenida de Spellberg, 2004<sup>1</sup>



En la Tabla 2 se presentan las nuevas moléculas antimicrobianas desarrolladas de acuerdo la indicación terapéutica comparando con el desarrollo del año de 1998-2003 y el periodo que comprende desde el año 2015 al mes de mayo del 2018<sup>3,4,5,6</sup>.

Blanco terapéutico de las nuevas moléculas antimicrobianas	Número de nuevas moléculas	
	1998-2002 <sup>1</sup>	2015-mayo 2018 <sup>3,4,5,6</sup>
Anti-VIH	12	2
Otros antivirales	5	5
Antibacterianos	5	8
Antiparasitarios	5	1
Antifúngicos	3	1
Dérmicos	1	0
TOTAL	31	17

Tabla 2 Nuevas moléculas antimicrobianas clasificadas de acuerdo con el blanco terapéutico en los periodos de 1998-2002 y 2015-2018

En donde se observa que hay un crecimiento en el desarrollo de antibacterianos debido a que la incidencia en infecciones bacterianas es más frecuente respecto a las infecciones causadas por hongos y parásitos, sin embargo es importante enfatizar que las enfermedades causadas por estos microorganismos también representan un problema de salud a nivel mundial que debe ser atendido, ya que, en las últimas décadas se han incrementado los casos de infecciones fúngicas oportunistas como la candidiasis, sin embargo los antifúngicos son muy escasos aunque muy efectivos, por ejemplo la AmB y la flucitosina que siguen siendo ampliamente utilizadas por su efectividad a pesar de los severos efectos adversos<sup>7</sup>, que llevaron al desarrollo de nuevos antifúngicos con menos efectos adversos, en la Figura 2 se muestra la evolución histórica de los antifúngicos y en la actualidad se encuentran diferentes moléculas en fase preclínica y clínicas de fase 2 (Tabla 1) como la nikkomicina Z, anticuerpos monoclonales y análogos



de anfotericina<sup>7</sup>. Es importante apoyar el desarrollo de nuevas moléculas para combatir enfermedades causadas por microorganismos oportunistas que llevan a la muerte a un gran número de individuos. Por esta razón, el presente trabajo se enfoca a la molécula A21, un derivado de la Anfotericina B.

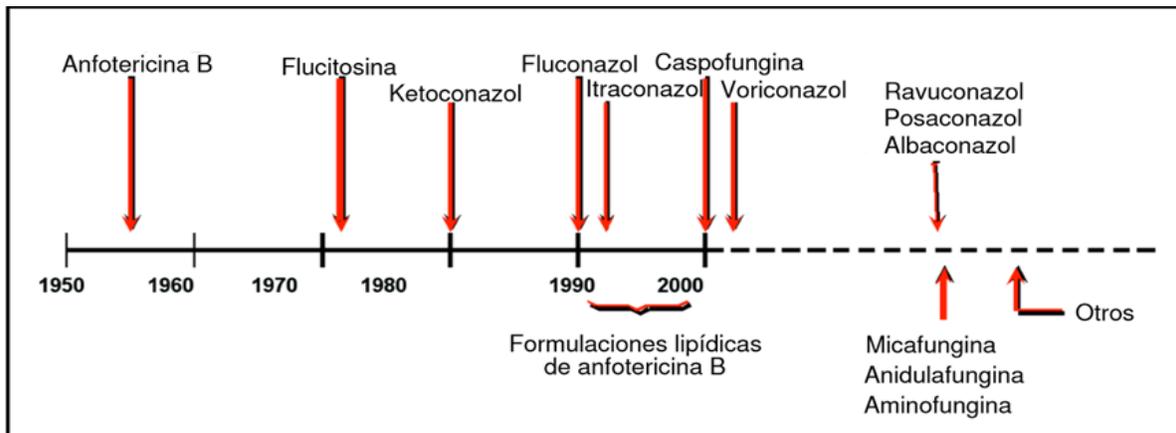


Figura 2. Historia del desarrollo de antifúngicos. Tomada de Catalán M, 2006<sup>7</sup>.

### 3.2 Anfotericina B

La anfotericina B, fue descubierta en el año de 1955 y es el estándar de oro para las infecciones micóticas sistémicas al ser efectiva contra la mayoría de ellas. Es producida por el actinomiceto *Streptomyces nodosus* y consiste en un macrólido heptaeno formado por una porción hidrofílica: conteniendo carbonos hidroxilados y una porción hidrofóbica, formada por siete átomos de carbono unidos por dobles enlaces por lo que se denomina polieno. La molécula también posee una cadena lateral que es una aminodesoxihexosa<sup>7</sup>. Su estructura se presenta en la Figura 3<sup>8</sup>.

Actualmente, se han desarrollado diferentes presentaciones de anfotericina teniendo como finalidad la reducción de los efectos tóxicos, así como la de mejorar la seguridad del antifúngico conservando su amplio espectro y su baja tasa de resistencia<sup>8</sup>. La Anfotericina B desoxicolato (AmBD), es la presentación convencional, compuesta por desoxicolato de sodio como principio activo y fosfato de sodio como excipiente, también se encuentra la anfotericina B liposomal (AmBL) que consiste en un compuesto de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol,



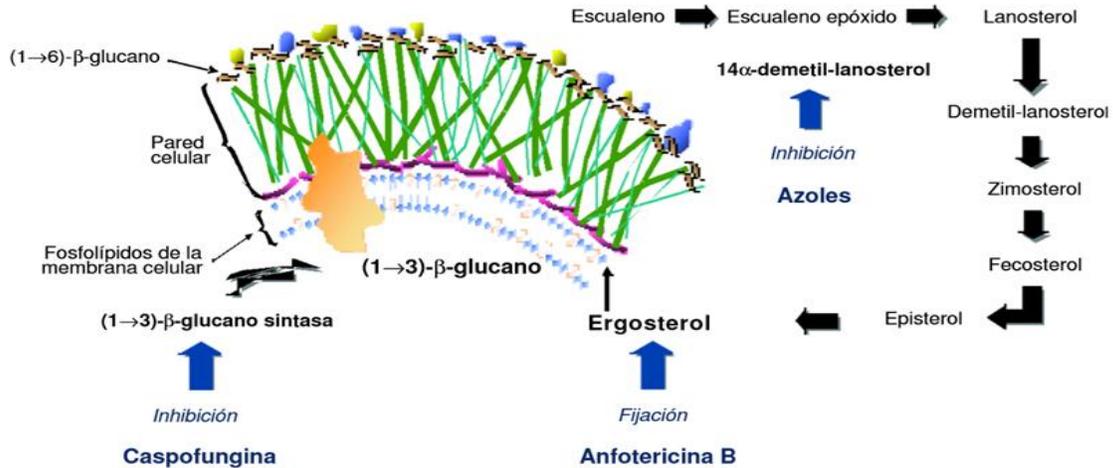


Figura 4. Mecanismo de acción de diferentes antifúngicos. (Catalán, 2006)<sup>7</sup>

### 3.2.2 Espectro e indicaciones terapéuticas de AmB<sup>9</sup>

La AmB se utiliza en infecciones causadas por:

Levaduras: *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula sp*.

Hongos dimórficos y bifásicos: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, complejo *Sporothrix schenckii*.

Hongos filamentosos: Mucorales (*Rhizopus sp*, *Mucor spp*, *Lichteimia*, *Conidiobulus* y *Basidiobulus*) y *Aspergillus spp*.

La AmB es el tratamiento de elección para micosis sistémicas profundas como candidiosis invasiva, criptococosis, coccidiodomicosis, histoplasmosis, mucormicosis, aspergilosis, esporotricosis hematogénea y también como antiparasitario por su acción frente a la leishmaniasis cutánea y visceral (AmBL)<sup>9</sup>.



### 3.2.3. Reacciones adversas, interacciones y contraindicaciones del uso de AmB<sup>9</sup>

Los efectos adversos se clasifican en dos, en agudos que incluyen fiebre, escalofrío, náuseas, vómito, tromboflebitis, cefalea, mialgias, artralgias, broncoespasmo, hipotensión y arritmias, y en efectos adversos crónicos incluyen nefrotoxicidad, alteraciones electrolíticas (hipocalemia, hipomagnesemia) y anemia normocítica normocrómica<sup>9</sup>.

La AmB tiene interacción con pentamidina, aminoglucósidos, antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y ciclosporina por riesgo de aumentar los efectos nefrotóxicos, además de que el usar digitálicos o relajantes musculares incrementa el riesgo de hipocalemia<sup>8</sup>.

Está contraindicada con personas sensibles a la molécula o con problemas hepáticos o renales<sup>8</sup>.

### 3.2.4. Propiedades fisicoquímicas de AmB<sup>8, 10</sup>.

Las propiedades de AmB se describen en la Tabla 3.

Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de AmB.

Propiedad	Valor de AmB
Fórmula química condensada.	$C_{47}H_{73}NO_{17}$
Peso molecular (g/mol)	924.08
Estado	Sólido
Punto de fusión (°C)	170.0
Solubilidad en agua (mg/mL)	0.0819
Log P	-0.66
pKa (ácido)	3.58
pKa (básico)	9.11
Longitud de onda de absorción (nm)	345,363,382,406



### 3.2.5. Farmacocinética de AmB

La vía de administración es intravenosa debido a que la administración oral tiene solo un 5% de absorción. Se une a lipoproteínas del plasma en un 90-95%<sup>7</sup>. Los valores farmacocinéticos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4 Parámetros farmacocinéticos de AmB

Parámetro	Valor
Dosis (mg/Kg/día)	0.5-1.0
C <sub>max</sub> (µg/mL)	2.0-3.6
ABC (µg/mL/h)	34
Cl (ml/h/Kg)	40.2
Vd (l/Kg)	4
t <sub>½</sub> (h)	24-34

Alcanza altas concentraciones en hígado, bazo, pulmón y riñones, se metaboliza parcialmente en hígado y se elimina por bilis (<15%) y por orina en escasa proporción (4-5%)<sup>7</sup>.



### 3.2.6. Métodos de cuantificación por CLAR de AmB<sup>11, 12,13, 14, 15</sup>

En la tabla 5 se presentan las condiciones cromatográficas utilizadas para la cuantificación de AmB por CLAR.

Tabla 5 Métodos de cuantificación por CLAR de AmB.

<b>Autor/Año</b>	<b>Columna cromatográfica</b>	<b>Condiciones cromatográficas</b>	
Flores Romero, 2016 <sup>23</sup>	Symmetry C18 4.6 x 75 mm, 3.5 µm	<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo:Buffer ac. acético/ trietilamina 30mM pH 4
		<b>%V/V</b>	30:70 v/v
		<b>λ</b>	383 nm
		<b>Velocidad de flujo</b>	1 mL/min
		<b>Vol. de inyección</b>	NE
		<b>Tiempo de retención</b>	8 min.
Balabathula <i>et al</i> ,2013 <sup>11</sup>	Waters XBridge™ C18 150mm X 4.6 mm, 3.5 µm	<b>Fase móvil</b>	Ácido acético (0.73%)-acetonitrilo
		<b>%V/V</b>	60:40 v/v.
		<b>λ</b>	408 nm
		<b>Velocidad de flujo</b>	1 ml/min
		<b>Vol. de inyección</b>	20 µL
		<b>Tiempo de retención</b>	2.7 min
Espada R <i>et al</i> . 2007 <sup>12</sup>	Thermo Hypersil BDS C18 250 x 4.6 mm 5 µm	<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo: Ácido Acético:Agua
		<b>%V/V</b>	52:4.3:43.7, v/v/v
		<b>λ</b>	406 nm
		<b>Velocidad de flujo</b>	1 ml/min
		<b>Vol. de inyección</b>	NE
		<b>Tiempo de retención</b>	12 min
Ihor Bekersky <i>et al</i> . 2001 <sup>13</sup>	Symmetry C18, 3-mm x 150 mm 3-µm	<b>Fase móvil</b>	Metanol: Agua: Ácido Acético
		<b>%V/V</b>	69:29:2 v/v/v
		<b>λ</b>	408 nm
		<b>Velocidad de flujo</b>	1 ml/min
		<b>Vol. de inyección</b>	NE
		<b>Tiempo de retención</b>	NE
Echevarría I <i>et al</i> . 1998 <sup>1</sup>	Ultrabase C18, 250 mmx4.6 mm, 5 µm	<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo: ácido acético 10%:Agua (41:43:16)
		<b>%V/V</b>	
		<b>λ</b>	405 nm
		<b>Velocidad de flujo</b>	1 ml/min
		<b>Vol. de inyección</b>	NE
		<b>Tiempo de retención</b>	5.8 min
Wang LH, <i>et al</i> 1992 <sup>15</sup>	Waters, µBondpak C18, 300 mm x 3.9 mm, 10- µm	<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo:2.5 mM Na2EDTA
		<b>%V/V</b>	45:55 v/v
		<b>λ</b>	382 nm
		<b>Velocidad de flujo</b>	1 mL/min
		<b>Vol. de inyección</b>	NE
		<b>Tiempo de retención</b>	NE

NE=No especifica.



### 3.3 Análogos de AmB

Durante los últimos años, el interés en el mecanismo de acción y en los derivados de AmB han cobrado gran importancia por la efectividad de este antifúngico y se han desarrollado diferentes moléculas que tienen como objetivo el mantener la efectividad de AmB pero aumentando su seguridad al disminuir su toxicidad<sup>23</sup>. En la literatura ya se encuentran diferentes análogos de AmB que tienen modificaciones estructurales en distintos sitios de la molécula.

Entre estas moléculas se encuentra la modificación en la cadena del polieno<sup>16</sup>, la derivatización del grupo amino en el anillo de micosamina<sup>17</sup>, eliminación de la función del ácido carboxílico exocíclico<sup>18</sup>, síntesis de derivados de AmB fluorados<sup>19</sup>, dímeros covalentes entre el grupo amino y el carboxílico<sup>20</sup> y los estudios más recientes prueban la eliminación del grupo -OH del C-3<sup>21</sup> y el C-35<sup>22</sup>.

### 3.4 Análogo de AmB: A-21

El grupo del doctor Iván Ortega desarrolló un análogo de AmB al que denominó A-21 (Fig 5), este compuesto consiste en la preparación de una amida mediante el acoplamiento de un éster metílico, *L-histidina*. Al que prestaron gran interés porque demostró tener la misma efectividad de AmB pero un margen de seguridad aumentado de acuerdo a las pruebas realizadas en ratones Balb-C, en el que la DL<sub>50</sub> para AmB luego de una administración intravenosa durante 48 horas es de 4.13 mg/Kg mientras que para A-21 la DL<sub>50</sub> fue de 49.82 mg/Kg mostrando un incremento en la seguridad<sup>23</sup>. Sin embargo, al evaluar la seguridad de A-21 en una cepa isogénica como Balb-C, no se puede asumir que los datos obtenidos sean realmente confiables debido a que no existe variabilidad entre individuos, por lo que resulta de gran importancia realizar pruebas preclínicas con cepas exogámicas,

La molécula ha sido evaluada en modelos preclínicos de toxicidad aguda y en modelos microbiológicos *in vitro* para probar su efectividad como antimicótico. En el



año 2016 el grupo del doctor Ortega realizó un método de síntesis a gran escala<sup>23</sup> para poder realizar los estudios de farmacocinética, ciertas pruebas preclínicas y así tener la entrada a estudios clínicos.

La información de la caracterización fisicoquímica de A-21 es escasa.

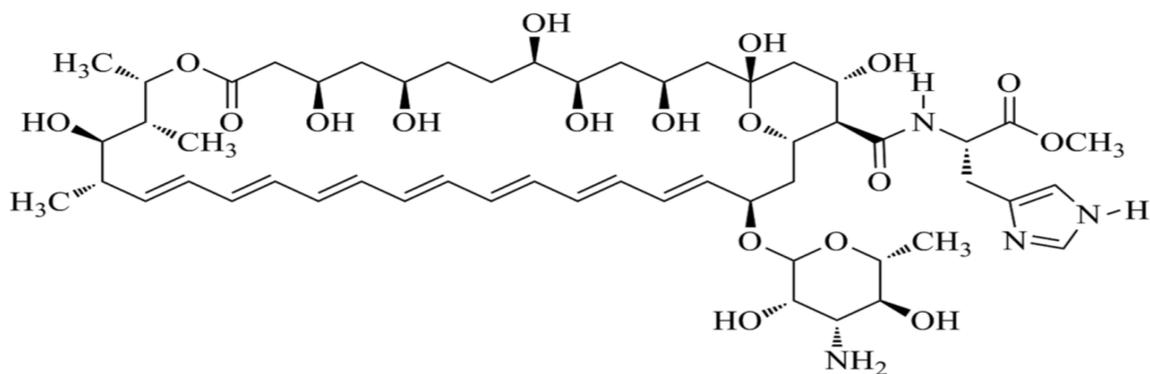


Figura 5. Estructura química de A-21. Obtenido de Flores-Romero, 2016<sup>23</sup>.

### 3.5 Desarrollo de métodos analíticos

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades y de parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra<sup>24</sup>. El desarrollo de métodos analíticos es de gran importancia en el área de control farmacéutico así como en estudios farmacológicos como la farmacocinética y la biodisponibilidad. Para realizar estos estudios es necesario contar con métodos validados que aseguren que se cumple con el propósito para el que fueron diseñados.

Toda la información del desarrollo del método debe estar documentada y el/los analistas que vayan a hacer uso de este deberán estar capacitados adecuadamente y demostrar la competencia para hacer uso del método<sup>25</sup>.

La calificación y verificación de los instrumentos y equipos utilizados en el laboratorio deben estar bien documentados para descartar posibles fluctuaciones que pudieran generar errores en los resultados obtenidos de la medición en dichos instrumentos o equipos<sup>25</sup>.



### 3.6 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un técnica cualitativa y cuantitativa muy importante y ampliamente utilizada para la separación, identificación y cuantificación de compuestos de interés<sup>26</sup>, la principal ventaja es la de poder detectar compuestos en concentraciones muy bajas, del orden de ng/ml<sup>27</sup>, además de que la técnica permite purificar las muestras luego de determinar las condiciones más adecuadas en las que el compuesto de interés se encuentre aislado de las impurezas<sup>26</sup>.

La técnica de CLAR tiene aplicaciones importantes en el área farmacéutica, bioquímica, clínica, forense, alimentaria, industria química y ambiental<sup>26</sup>, en la identificación de fármacos, estudios de disolución para la cuantificación, en el bio-monitoreo de sustancias tóxicas, determinación de sustancias de abuso en sangre, análisis enzimático en muestras de plasma, análisis de composición de alimentos, entre otras.

#### 3.6.1 El proceso cromatográfico.

El proceso consiste en el paso de un líquido (fase móvil) que circula al interior de una columna a alta presión en contacto con un sólido inmisible con características químicas específicas de acuerdo al análisis (fase estacionaria)<sup>28</sup>, al realizar la inyección en pequeños volúmenes de la mezcla de sustancias que contienen el/los analito(s) de interés en la corriente de la fase móvil, estos se van desplazando a lo largo del sistema con una velocidad diferente de acuerdo a la afinidad por cada fase, teniendo como resultado la separación de las sustancias que componen la mezcla las cuales pueden ser cuantificadas por separado por un detector UV/Vis que transforma estos datos en un cromatograma para ser analizado<sup>29</sup>.



---

### 3.6.2 Tipos de cromatografía

Los tipos de cromatografía se basan en el sistema de fases que utilizan para su análisis, las que se utilizan con mayor frecuencia se describen a continuación:

#### 3.6.2.1 Cromatografía de reparto

Dentro de este tipo de cromatografía se encuentra la cromatografía de fase normal que consiste en una fase estacionaria de carácter polar y la fase móvil de carácter no polar<sup>30</sup>, el principio de este tipo de cromatografía es la interacción de analito polar con la fase estacionaria, por lo que el tiempo de elución se ve afectado por el grado de polaridad del analito<sup>26</sup>. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente como la sílice o alúmina, también puede ser un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas con grupos de alta polaridad como los grupos ciano, amino, etc.<sup>28</sup>

También se encuentra la cromatografía de fase reversa que es ampliamente utilizada y consiste en una fase estacionaria no polar que son cadenas hidrocarbonadas o con grupos fenilo y una fase móvil polar que utiliza como solventes principalmente el acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano con agua. que producen interacciones inespecíficas<sup>28</sup>. La retención está basada en una atracción primaria entre la fase estacionaria y la región no polar del analito<sup>30</sup>.

#### 3.6.2.2 Cromatografía de adsorción

La fase estacionaria es un adsorbente polar, dividido finamente y este tipo de cromatografía se basa en la separación en repetidas etapas de adsorción-desorción<sup>28</sup>, debido a que el analito compite con la fase móvil por los sitios sobre la superficie del empaquetamiento y la retención se da por el fenómeno de adsorción<sup>27</sup>.



### 3.6.2.3 Cromatografía de exclusión molecular

La fase estacionaria consiste en un material poroso de tamaño de poro controlado, cuyo principio está basado en el tamaño de la molécula ya que el tamaño de poro permite el paso de determinados analitos<sup>28</sup> su aplicación principal es para determinar estructuras terciarias y cuaternarias de proteínas y para el cálculo de peso molecular de polisacáridos<sup>26</sup>.

### 3.6.2.4 Cromatografía de intercambio iónico

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria presenta en la superficie grupos ionizados capaces de retener iones con carga contraria que se encuentren en la fase móvil<sup>28</sup> una aplicación de este tipo de cromatografía es la purificación de agua<sup>26</sup>.

### 3.6.2.5 Cromatografía de Bio-afinidad

Consiste en la formación de un enlace covalente entre un ligando con un soporte sólido de manera reversible, utilizando como principio la selección específica de moléculas como enzimas por sustratos o anticuerpos con antígenos<sup>30</sup>, el principio de esta técnica se ejemplifica en la figura 6, esta técnica se utiliza para la purificación de ciertas muestras en las que se encuentra el analito de interés en una mezcla de componentes<sup>26</sup>.

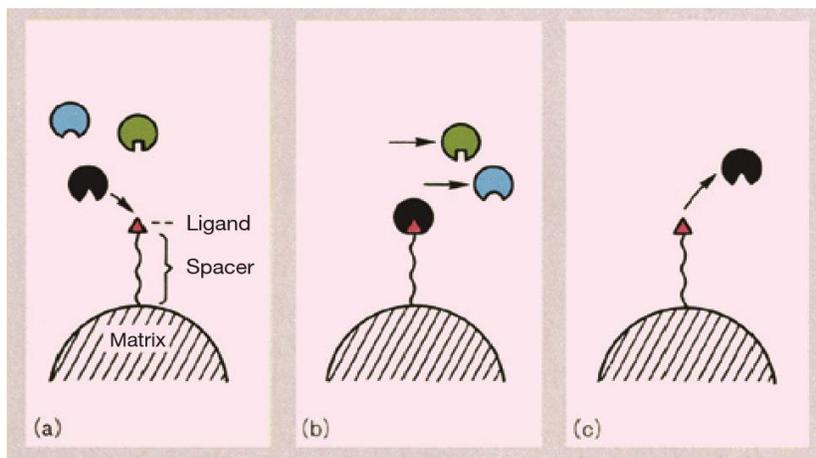


Figura 6. Principio de la cromatografía de afinidad<sup>30</sup>.



### 3.6.3 Instrumentación en CLAR

La instrumentación para el proceso de cromatografía se resume en la figura 7 y la función de cada uno de los componentes se describe brevemente en el siguiente listado.

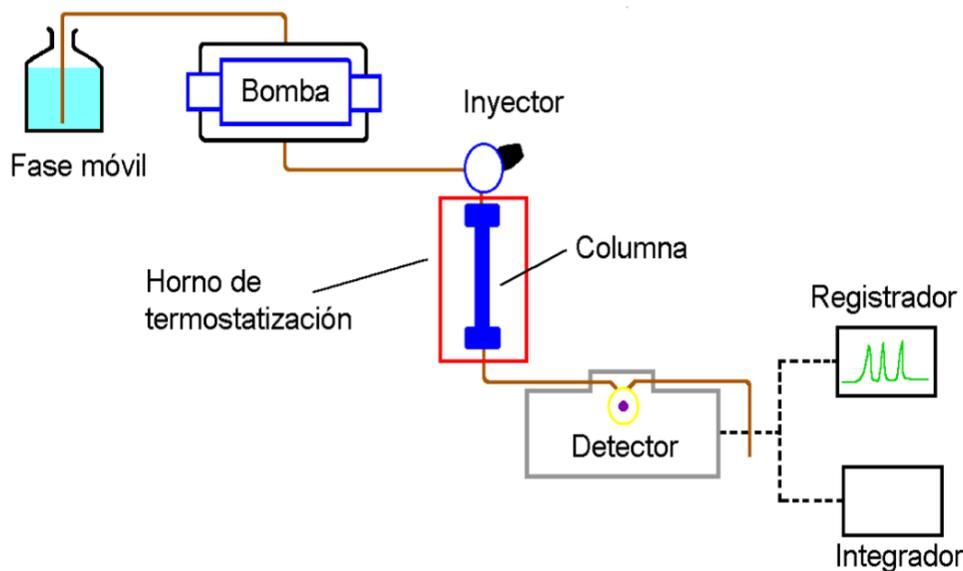


Figura 7. Esquema de instrumentos que componen el proceso cromatográfico<sup>28</sup>.

#### 3.6.3.1 Bomba

Su función consiste en suministrar un flujo constante y sin pulsos de la fase móvil a través de la columna, sin que el flujo sea influido por posibles obstrucciones en la columna<sup>28</sup>.

Las bombas deben cumplir con requisitos como el poder trabajar a presiones elevadas, salidas libres de pulsos, velocidades de flujo constantes y con un intervalo de 0.1-10 ml/min, además de estar compuestas de materiales inertes a los componentes de la fase móvil.

Existen diferentes tipos de bombas, las de jeringa impulsada con tornillo, las bombas oscilantes y las bombas neumáticas o de presión constante<sup>27</sup>.



### **3.6.3.2 Sistemas de inyección**

Los inyectores deben cumplir con ser de fácil manejo, dar resultados reproducibles por lo que deben estar calibrados, introducir la muestra de manera adecuada y poder trabajar a presiones elevadas<sup>28</sup>.

Existen dos tipos de sistemas de inyección, el manual y el de válvula o automático. El manual consiste en el uso de una microjeringa que se introduce a través del septum, sin embargo, este método es muy poco reproducible y representa dificultad de manejo.

El sistema de inyección automático resulta altamente reproducible y de uso sencillo ya que la inyección está controlada por una válvula que toma el volumen previamente programado de un vial preseleccionado, realiza la inyección y el lavado de todo el sistema<sup>27</sup>.

### **3.6.3.3 Columna cromatográfica**

Están elaboradas con tubos de acero inoxidable, la mayoría de ellas va de 75 mm-300 mm de longitud y un diámetro interno de 2 mm- 5mm, los empaquetamientos suelen tener un tamaño de partícula de 2,5 a 10  $\mu\text{m}$  y están compuestos por partículas de sílice que son sintetizadas por aglomeración de partículas que producen partículas más grandes y de diámetro uniforme y que son tratadas con películas orgánicas finas enlazadas física o químicamente.<sup>27</sup>

#### **3.6.3.3.1 Precolumnas**

Son aditamentos que se colocan en la entrada de la columna cromatográfica como medio de protección, ya que su función consiste en la extracción de partículas y contaminantes que pudieran afectar la vida útil de la columna. La composición de las precolumnas debe ser similar a la composición de la columna a excepción del tamaño de partícula que tiende a ser mayor<sup>27</sup>.



#### **3.6.3.4 Detector**

Un detector es un instrumento que transforma la respuesta en un medio gráfico a través de la medición de ciertas propiedades físicas generadas por los analitos presentes en la muestra<sup>28</sup>. El detector utilizado para cada proceso cromatográfico depende directamente de la naturaleza del analito a evaluar<sup>31</sup>. Los más utilizados se basan en la absorción de radiación ultravioleta o visible aunque existen otros tipos de detectores que basan su fundamento de detección en<sup>28</sup>:

- Índice de refracción.
- Electroquímicos.
- Fluorescencia.
- Espectrometría de masas.
- Conductividad eléctrica.

### **3.7 Preparación de muestras para extraer un fármaco de una matriz biológica**

Para realizar un análisis adecuado de un analito que se encuentra inmerso en una matriz biológica es necesario aplicar procedimientos con distintos objetivos para optimizar la sensibilidad y eliminar contaminantes que pongan en riesgo el equipo de CLAR.

Los objetivos son:

- Concentración: Mejorar la cuantificación del analito.
- Separación: Separar el analito de interés de otros componentes de la muestra.
- Purificación: Eliminar interferencias y suciedad presente en la matriz a evaluar.

Los métodos de extracción y purificación de las muestras se explican a continuación y dependiendo la naturaleza de la muestra se pueden aplicar uno o más de uno.



### 3.7.1 Método de extracción líquido-líquido

Consiste en la mezcla de dos sustancias líquidas inmiscibles que forman dos fases, generalmente una de ellas es la fase orgánica y la otra es la fase acuosa. La elección del disolvente orgánico a utilizar en la extracción dependerá de la solubilidad del analito en dicho disolvente así como el volumen que se debe utilizar<sup>33</sup>, se debe tomar en cuenta que a mayor volumen de disolvente orgánico se invertirá un mayor tiempo de evaporación, también es importante tomar en cuenta la toxicidad de los disolventes a utilizar. En la figura 8 se muestra un esquema del método de extracción líquido-líquido. Las ventajas de este método son: concentración, purificación y aislamiento del analito de interés<sup>34</sup>. Como desventaja se encuentra la solubilidad de los analitos y la formación de emulsiones.

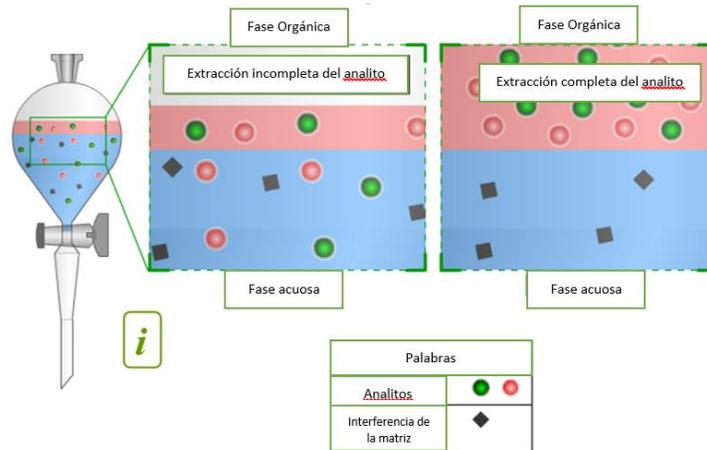


Figura 8. Esquema de la extracción líquido-líquido<sup>33</sup>.

### 3.7.2 Método de extracción Sólido-Líquido

Este método consiste en el paso de la matriz biológica a través de una membrana con propiedades características que puede funcionar de dos formas dependiendo el peso molecular del analito, uno de ellos es retener el/los analitos y algunos contaminantes o bien, que los analitos eluyan y se retengan los contaminantes de la muestra<sup>34</sup>. Las ventajas de este método son la purificación de la muestra y la concentración del analito de interés. La desventaja es que no concentra la muestra y es costoso.



El proceso de extracción sólido-líquido consiste en la activación del cartucho que contiene la membrana que va a ser la fase sólida del método con algún disolvente, luego se pasa a la fase de activación, la carga, el lavado y finalmente la elución, en este último paso se recupera el analito de interés concentrado<sup>35</sup>.

### **3.7.3 Precipitación de proteínas**

Consiste en la adición de un agente precipitante a la matriz biológica y mediante agitación, desnaturalizar las proteínas presentes en el plasma, luego de realizar la precipitación, la muestra se centrifuga y se recupera el sobrenadante que será la muestra que se inyectará al sistema cromatográfico<sup>36</sup>.

#### **3.7.3.1 Métodos de precipitación de proteínas:**

- Precipitación con sales: elimina el agua de la proteína hidratada dejando las regiones hidrofóbicas expuestas por efecto de solvatación<sup>38</sup>.
- Precipitación isoeléctrica: ocurre por la disminución de la solubilidad a causa de la modificación del pH, llevándolo por debajo o encima del punto isoeléctrico de las proteínas<sup>38</sup>.
- Precipitación con polímeros no iónicos: sigue el mismo mecanismo de precipitación por sales o disolventes<sup>38</sup>.
- Precipitación con disolventes orgánicos: se disminuye la solubilidad de las proteínas a causa de que el disolvente orgánico presenta una constante dieléctrica menor al agua, lo que provoca un incremento en la atracción cargas opuestas y disminución en el grado de ionización en los radicales de las proteínas<sup>38</sup>.



### 3.7.3.2 Agentes precipitantes de proteínas

En la tabla 6 se presentan los principales agentes precipitantes de proteínas

Tabla 6 Agentes precipitantes de proteínas<sup>37</sup>

Precipitación de proteínas	Agentes precipitantes.
Precipitación con sales	Cloruro de aluminio Sulfato de amonio
Precipitación isoeléctrica	Ácido tricloroacético(TCA) Ácido fosfórico Hidróxido de sodio
Iones metálicos	Sulfato de zinc ( $ZnSO_4$ )
Polímeros no iónicos	Polietilenglicol (PEG)
Solventes orgánicos.	Acetonitrilo Metanol Etanol



## 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiales, reactivos, instrumentos, equipos

#### 4.1.1 Materiales

- Matraces volumétricos de 5.0mL, 10.0 mL, 25.0mL, 100.0mL, 250mL.
- Vasos de precipitado de 50mL, 100 mL, 150mL, 250mL.
- Probetas de 10ml, 50mL, 100ml, 250 mL, 500 mL.
- Frascos de vidrio con tapón de plástico de 250mL, 500 mL, 1000mL.
- Tubos de ensaye de 13\*100 mm.
- Tubos de ensaye 13\*100 mm con tapón de rosca.
- Tubos falcon de 15mL y 50 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Espátula.
- Nave de vidrio.
- Agitadores magnéticos.
- Puntas para micropipeta de 100-1000 $\mu$ L, 500-5000 $\mu$ L, 1-10 mL
- Viales para cromatógrafo.
- Microviales para cromatógrafo.
- Precolumna Phenomenex KJO-4282.
- Tubos eppendorf de 500  $\mu$ L y 300 $\mu$ L.
- Gradillas para tubos de ensaye y tubos eppendorf.
- Columna cromatográfica Symetry C18 dimensiones 75 x 4.6mm y 3.5 $\mu$ m de tamaño de partícula.
- Columna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB C18 dimensiones 150 x 4.6mm y 5.0 $\mu$ m de tamaño de partícula.
- Columna cromatográfica  $\mu$ Bondapack C18 dimensiones 300 x 3.9mm
- Columna cromatográfica Spherisorb CN-RP dimensiones 250 x 3.9mm 5.0  $\mu$ m de tamaño de partícula.

#### 4.1.2. Reactivos

- Compuesto A-21. Pureza 81%
- Metanol (MeOH), CH<sub>3</sub>OH, grado HPLC, (J.T. Baker).
- Acetonitrilo (ACN), CH<sub>3</sub>CN, grado HPLC, (JT. Baker).
- Agua destilada (Elix-3, Millipore).
- Agua desionizada grado HPLC (Milli-Q, Millipore).
- Ácido acético glacial, (Ac) CH<sub>3</sub>COOH (J.T. Baker)
- Hidroxido de sodio, NaOH (J.T. Baker).
- Fosfato monobásico de sodio. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. (J.T.Baker).
- Fosfato dibásico de sodio. NaHPO<sub>4</sub>. (J.T. Baker)



- Acetato de Sodio.  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . (J.T.Baker)
- Trietilamina.  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ . (Tecsiquim)
- Ácido tricloroacético.
- Sulfato de Zinc.Reactivo analítico Pureza 99.0% (Monterrey)
- Acetato de etilo. Grado analítico (Mallinckrodt AR)
- Hexano. (J.T. Baker)
- Xileno.(Sigma Aldrich)
- Metil ter-butil éter. Grado HPLC (J.T. Baker)
- Éter etílico. Grado analítico (Meyer)
- Cloruro de metileno. Grado analítico (Sigma- Aldrich)
- 1-octanol.(J.T., Baker)
- Plasma Humano (Banco de sangre del Hospital Médica Sur).
- Plasma de rata Wistar macho.
- Plasma de ratón ICR macho.

#### 4.1.3. Instrumentos y equipos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu modelo LC10AT con detector UV-Visible Shimadzu modelo SPD-10AV; Software LCsolution versión 1.25 Shimadzu Corporation.
- Balanza analítica Sartorius.
- Potenciómetro Thermo Orion Star A211.
- Agitador Vórtex MX-S de Science MED Finland Technology.
- Espectrofotómetro UV-Visible 1601 Shimadzu.
- Baño ultrasónico Fischer Scientific FS60.
- Centrifuga eppendorf 5416.
- Equipo de filtración Millipore.
- Microcentrifuga eppendorf.
- Agitador Lab-line 3520 Orbital Platform Shaker.
- Congelador Lab-line, modelo 3552 a  $-22^\circ\text{C}$ .
- Parrilla de agitación magnética.
- Micropipeta Eppendorf 100-1000 $\mu\text{L}$
- Micropipeta Eppendorf 500-5000 $\mu\text{L}$
- Micropipeta Eppendorf 1-10mL
- Centrifuga Eppendorf Vacufuge plus.



## **4.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES**

### **4.2.1 Fase móvil (F.M.). Acetonitrilo: Disolución de ácido acético [0.05M] pH 5 con trietilamina, (45:55)**

Para preparar 1000 mL de F.M. se mezclaron 550 mL de la disolución ácida(4.2.2) con 450 mL de acetonitrilo grado HPLC, previamente filtrado a vacío con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , la disolución se colocó en baño ultrasónico durante 30 minutos.

### **4.2.2 Disolución de ácido acético [0.05 M] pH 5.00 ajustado con trietilamina**

Para preparar 250 mL de disolución, se midieron 0.715 mL de ácido acético glacial y se adicionaron a 150 mL de agua MilliQ con agitación constante en parrilla de agitación magnética, se midió y ajustó el pH a 5 con trietilamina con ayuda de un potenciómetro previamente calibrado, se aforó a volumen de 250 mL con agua MilliQ y la solución se filtró al vacío con membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### **4.2.3 Disolución amortiguadora de acetatos pH 4.00 [0.05 M]**

Para preparar 250 mL se midieron 0.715 mL de ácido acético glacial y se pesaron 0.275 g de acetato de sodio, los cuales se adicionaron a 150 mL de agua Milli Q en constante agitación, se midió el pH con un potenciómetro previamente calibrado y se ajustó a pH 4.00  $\pm$  0.1 con NaOH 2N. La disolución se llevó a aforo de 250 mL con agua Milli Q y posteriormente se filtró al vacío con membrana 0.45  $\mu\text{m}$ .

### **4.2.4 Disolución amortiguadora de acetatos pH 5.00 [0.05 M]**

Para preparar 250 mL se midieron 0.715 mL de ácido acético glacial y se pesaron 2.71 g de acetato de sodio, los cuales se adicionaron a 150 mL de agua Milli Q en constante agitación, se midió el pH con un potenciómetro previamente calibrado y se ajustó a pH 5.00  $\pm$  0.1 con NaOH 2N. La disolución se llevó a aforo de 250 mL con agua Milli Q y posteriormente se filtró al vacío con membrana 0.45  $\mu\text{m}$ .



#### **4.2.5 Disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.00 [0.05 M]**

Para preparar 250 mL se pesaron 1.7078 g de fosfato monobásico de sodio y 0.112 g de fosfato dibásico de sodio, los cuales se adicionaron a 150 mL de agua Milli Q en constante agitación, se midió el pH con un potenciómetro previamente calibrado y se ajustó a  $\text{pH } 6.00 \pm 0.1$  con NaOH 2N. La disolución se llevó a aforo de 250 mL con Agua Milli Q y posteriormente se filtró al vacío con membrana  $0.45 \mu\text{m}$ .

#### **4.2.6 Disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.80 [0.05 M]**

Para preparar 250 mL se pesaron 1.366 g de fosfato monobásico de sodio y 0.569 g de fosfato dibásico de sodio, los cuales se adicionaron a 150 mL de agua Milli Q en constante agitación, se midió el pH con un potenciómetro previamente calibrado y se ajustó a  $\text{pH } 6.80 \pm 0.1$  con NaOH 2N. La disolución se llevó a aforo de 250 mL con agua Milli Q y posteriormente se filtró al vacío con membrana  $0.45 \mu\text{m}$ .

#### **4.2.7 Disolución amortiguadora de fosfatos pH 7.20 [0.05 M]**

Para preparar 500 mL se pesaron 3.554 g de fosfato monobásico de sodio y 3.415 g de fosfato dibásico de sodio, los cuales se adicionaron a 500 mL de agua Milli Q en constante agitación, se midió el pH con un potenciómetro previamente calibrado y se ajustó a  $\text{pH } 7.20 \pm 0.1$  con NaOH 2N. La disolución se llevó a aforo de 500 mL con agua Milli Q y posteriormente se filtró al vacío con membrana  $0.45 \mu\text{m}$ .

#### **4.2.8 Disolución amortiguadora de fosfatos pH 7.40 [0.05 M]**

Para preparar 250 mL se pesaron 0.568 g de fosfato monobásico de sodio y 0.345g de fosfato dibásico de sodio, los cuales se adicionaron a 250 mL de agua Milli Q en constante agitación, se midió el pH con un potenciómetro previamente calibrado y se ajustó a  $\text{pH } 7.40 \pm 0.1$  con NaOH 2N. La disolución se llevó a aforo de 250 mL con agua Milli Q y posteriormente se filtró al vacío con membrana  $0.45 \mu\text{m}$ .



#### **4.2.9. FM. Acetonitrilo: Agua en proporción 50:50**

Para preparar un volumen de 1000 mL, se midieron 500 mL de agua milli Q y se mezclaron con 500 mL de acetonitrilo grado HPLC, previamente filtrado al vacío con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , la disolución se colocó en baño ultrasónico durante 30 minutos.

#### **4.2.10. FM. Acetonitrilo: Agua en proporción 45:55**

Para preparar un volumen de 1000 mL, se midieron 550 mL de agua milli Q y se mezclaron con 450 mL de acetonitrilo grado HPLC, previamente filtrado al vacío con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , la disolución se colocó en baño ultrasónico durante 30 minutos.

#### **4.2.11. FM. Acetonitrilo: Agua en proporción 55:45**

Para preparar un volumen de 1000 mL, se midieron 450 mL de agua milli Q y se mezclaron con 550 mL de acetonitrilo grado HPLC, previamente filtrado al vacío con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , la disolución se colocó en baño ultrasónico durante 30 minutos.

#### **4.2.12. FM. Acetonitrilo: Agua en proporción 40:60**

Para preparar un volumen de 1000 mL, se midieron 600 mL de agua milli Q y se mezclaron con 400 mL de acetonitrilo grado HPLC, previamente filtrado al vacío con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , la disolución se colocó en baño ultrasónico durante 30 minutos.

#### **4.2.13. FM. Acetonitrilo: Agua en proporción 30:70**

Para preparar un volumen de 1000 mL, se midieron 700 mL de agua milli Q y se mezclaron con 300 mL de acetonitrilo grado HPLC, previamente filtrado al vacío con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , la disolución se colocó en baño ultrasónico durante 30 minutos.



#### **4.2.14. FM. Metanol: Agua en proporción 50:50**

Para preparar un volumen de 1000 mL, se midieron 500 mL de agua milli Q y se mezclan con 500 mL de metanol grado HPLC, previamente filtrado al vacío con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , la disolución se colocó en baño ultrasónico durante 30 minutos.

#### **4.2.15 Disolución de Hidróxido de sodio 2N**

Para preparar 100 mL de esta solución, se pesaron con exactitud 8.0 g de NaOH y se llevaron a 50 mL de agua destilada hasta su disolución y se dejó enfriar para posteriormente aforar la disolución a 100mL.

#### **4.2.16 Disolución de Sulfato de Zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) al 10%**

Para preparar 100 mL se pesaron con exactitud 10 g de  $\text{ZnSO}_4$ , posteriormente se disolvió y aforó con agua destilada a 100 mL.

#### **4.2.17. Disolución de ácido tricloroacético (TCA) al 10%**

Para preparar 100 mL, se pesaron con exactitud 10 g de TCA, posteriormente se disolvió y aforó a 100 mL con agua destilada.

#### **4.2.18 Mezcla de Matriz Biológica**

A partir de 6 unidades de plasma fresco proporcionado por el banco de sangre del Hospital Médica Sur de la Ciudad de México, se tomaron 160 mL de plasma de cada unidad y se mezclaron, la solución fue fraccionada en alícuotas de 50 mL y se almacenó a  $-22^\circ\text{C}$ .

#### **4.2.19 Disoluciones de A-21**

##### **4.2.19.1 Disolución patrón de A-21 [1mg/mL]**

Se pesaron con exactitud  $5.0 \pm 0.1$  mg de A-21, se disolvieron con 0.5 mL de agua y se llevaron a aforo de 5 mL con solución 50:50 AcN:Agua para tener una concentración final de 1 mg/mL.



#### 4.2.19.2. Disolución Stock de A-21 en solución [100µg/mL]

Se midió un mililitro de la disolución de A-21 [1mg/mL] y se llevó a aforo con la fase móvil acetonitrilo: disolución de ácido acético [0.05M] pH 5 con trietilamina, (45:55). de 10 mL. Teniendo una concentración final de 100µg/mL.

#### 4.2.19.3 Esquema de preparación de disoluciones para pruebas en solución

Tabla 7 Esquema de preparación de disoluciones para pruebas en solución.

Disolución	Vol. (mL) Stock (100µg/mL)	Sol. A-21	Vol. (mL) aforo(Fase móvil)	Sol	Vol. Final (mL)	Concentración final de A-21 (µg/mL).
Blanco	0		10		10	0
1	2.5		7.5			25
2	2.0		8.0			20
3	1.5		8.5			15
4	1.0		9.0			10
5	0.5		9.5			5
6	0.2		9.8			2

#### 4.2.19.4 Esquema de preparación de disoluciones para pruebas en plasma

Se descongeló la mezcla de plasma dejando a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar a 3500 rpm/10 min, posteriormente la muestra de plasma se filtró a través de un embudo de filtración rápida acondicionado con papel filtro y luego se utilizó como disolución de aforo de acuerdo al siguiente esquema de preparación de disoluciones de A-21.



Tabla 8. Esquema de preparación de disoluciones para pruebas en plasma.

Disolución	Vol.(mL) Stock de A-21 (100µg/mL)	Sol. Vol.(mL) aforo (Plasma)	Sol	Vol. Final (mL)	Concentración de A-21 (µg/mL).
<b>Blanco</b>	0	10		10	0
<b>1</b>	2.0	8.0			20
<b>2</b>	1.5	8.5			15
<b>3</b>	1.0	9.0			10
<b>4</b>	0.5	9.5			5
<b>5</b>	0.2	9.8			2

#### 4.2.19.5 Esquema de preparación de disoluciones para prueba de recobro

Tabla 9. Esquema de preparación de disoluciones para prueba de recobro, usando SA a pH 7.4

Disolución	Vol.(mL) Stock (100µg/mL)	Sol. Vol.(mL) aforo (S.A. pH 7.4)	Sol	Vol. Final (mL)	Concentración de A-21 (µg/mL).
<b>Blanco</b>	0	10		10	0
<b>1</b>	2.0	8.0			20
<b>2</b>	1.5	8.5			15
<b>3</b>	1.0	9.0			10
<b>4</b>	0.5	9.5			5
<b>5</b>	0.2	9.8			2



### 4.3 Desarrollo de la metodología

#### 4.3.1 Elección de la técnica analítica para la cuantificación de A-21 en plasma

Se seleccionó la CLAR como método de cuantificación debido a que es una técnica ampliamente utilizada para la cuantificación e identificación de una gran cantidad de moléculas, además de ser un método selectivo al poder la diferenciar los componentes presentes en la muestra a evaluar.

A-21 es una molécula que posee en su estructura química un polieno con dobles enlaces conjugados y también una aminodesoxihexosa que permiten la absorción en el espectro ultravioleta.

##### 4.3.1.1 Selección de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de análisis

Se preparó una solución de A-21 a una concentración de 12.5 $\mu$ g/mL y se realizó un barrido espectrofotométrico en el rango de 190-500 nm del cuál se registran los valores de absorbancia en las longitudes de onda de absorción.

##### 4.3.1.2 Selección de la columna cromatográfica

Las columnas evaluadas en el presente trabajo, se describen en la tabla 10

Tabla 10 .Columnas cromatográficas evaluadas para el desarrollo del método.

Columna	Fase estacionaria	Longitud (mm)	Diámetro (mm)	Tamaño de partícula( $\mu$ m)
Symetry C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	75	4.6	3.5
Zorbax Eclipse	XDB C <sub>18</sub>	150	4.6	5.0
$\mu$ Bondapack	C <sub>18</sub>	300	3.9	N/E
Spherisorb	CN-RP	250	3.9	5.0

N/E: No especifica.



#### 4.3.1.3. Selección de la fase móvil. (F.M.)

Se evaluaron diferentes fases móviles utilizando diferentes proporciones del disolvente orgánico (acetonitrilo), pH, concentración de sales, disolución de ajuste y la influencia de la fuerza iónica.

##### 4.3.1.3.1. Proporciones del disolvente orgánico: fase acuosa

Las proporciones evaluadas se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Proporciones de F.M. evaluadas.

Composición	Proporción
ACN: Solución acuosa	70:30
	55:45
	50:50
	45:55
	40:60
	30:70

##### 4.3.1.3.2. Influencia del pH

Se evaluaron diferentes disoluciones en el intervalo de 4 a 7.2 de pH, las cuales se describen en la tabla 12.

Tabla 12. Soluciones a diferentes pH evaluadas en la fase móvil.

Solución amortiguadora	Concentración Molar	pH	Solución de ajuste de pH
Acetatos	0.05	4.0	NaOH 2N
	0.05	5.0	
Fosfatos	0.05	6.0	
	0.01	6.8	
	0.05	6.8	
	0.05	7.2	



#### **4.3.1.3.3. Influencia presencia de sales en la fase acuosa**

Se realizó la evaluación de la influencia del acetato de sodio en una solución amortiguadora de fosfatos [0.05M] a pH 5 ajustado con trietilamina y se comparó con una disolución de ácido acético [0.05 M] ajustado con trietilamina.

#### **4.3.1.4. Selección del volumen de inyección**

Para evaluar este parámetro, se realizaron inyecciones repetidas empleando distintos volúmenes de inyección en donde se evaluó la respuesta y la simetría del pico.

Los volúmenes evaluados fueron:

- 20 $\mu$ L
- 30 $\mu$ L

#### **4.3.1.5. Selección de velocidad del flujo**

Se evaluaron distintas velocidades de flujo y el impacto sobre el tiempo de retención y simetría del pico cromatográfico así como de la respuesta.

Las velocidades de flujo evaluadas fueron las siguientes:

- 0.6 mL/min.
- 0.8 mL/min.
- 1.0 mL/min.
- 1.2 mL/min.
- 1.5 mL/min.



#### **4.3.1.6. Curva de calibración en solución**

Se realizaron curvas de calibración por triplicado en el rango de concentración de 2 a 20  $\mu\text{g/mL}$  siguiendo el esquema descrito el punto **4.2.19.3 preparación de soluciones de A-21 para pruebas en solución** y se realizaron inyecciones bajo las condiciones cromatográficas establecidas. Se calculó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación  $r$  de la regresión lineal para evaluar la linealidad del método en sistema.

#### **4.3.2. Selección de las condiciones de extracción**

##### **4.3.2.1 Método de extracción líquido-líquido**

###### **4.3.2.1.1 Pruebas de solubilidad de A-21**

Se pesó por triplicado 1mg de A-21, a cada muestra se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de diferentes disolventes orgánicos para evaluar la solubilidad tomando como control positivo una solución de A-21 en agua en una concentración de 2 mg/mL. Se evaluó la coloración de la disolución como parámetro de solubilidad comparando con el control positivo (agua).

Los disolventes orgánicos evaluados fueron los siguientes.

- Acetato de etilo.
- Cloruro de metileno.
- Éter etílico.
- Metil ter-butyl éter.
- Xileno.
- 1-octanol.
- Hexano.

Las disoluciones que presentaron coloración fueron evaluadas adicionando el disolvente orgánico hasta lograr la disolución de 1 mg de A-21.



#### 4.3.2.1.2. Pruebas de extracción líquido-líquido

Se tomaron 0.5 mL de una muestra conteniendo A-21 en plasma [20 µg/mL], se adicionaron 3 mL del disolvente orgánico seleccionado a partir de las pruebas de solubilidad y se evaluaron por triplicado diferentes tipos de agitación, tiempo y velocidad de agitación. Las condiciones evaluadas se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Pruebas de extracción líquido-líquido.

# Prueba	Tipo de agitación	Tiempo (min)	Velocidad
1	Vortex	2	0.5
2		3	0.5
3		2	0.6
4		3	0.6
5	Agitación horizontal	10	5
6		15	5
7		20	5
8		10	6
9		15	6
10		20	6
11		10	7
12		15	7
13		20	7
14	Vortex	2	0.7
15	Vortex + A. horizontal	2 + 10	0.6 + 5

Al terminar de aplicar las pruebas de extracción, las muestras se congelaron a -22°C durante 10 minutos para solidificar la fase acuosa y se decantó la fase orgánica, la cual se evaporó durante 25 minutos, el sedimento se reconstituyó con 200 µL de fase móvil y se inyectaron al cromatógrafo bajo las condiciones seleccionadas (Tabla 20)



### 4.3.2.1 Precipitación de proteínas

#### 4.3.2.1.1 Prueba de precipitación de proteínas empleando diferentes agentes precipitantes

Se tomaron muestras blanco de plasma conteniendo A-21 a una concentración de 20µg/mL y se evaluaron distintos agentes precipitantes de proteínas, tiempos de agitación, reposo y centrifugación (tabla 14). Después de la centrifugación se separó el sobrenadante y se inyectó al cromatógrafo bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas (Tabla 20) para evaluar las respuestas analíticas y con base en la intensidad y tiempo de retención de las respuestas presentes en los cromatogramas con los diferentes métodos se selecciona el método más eficiente para la preparación de muestras para el análisis de A-21 en matriz biológica.

Tabla 14. Procedimientos aplicados para la evaluación del método de precipitación de proteínas para la extracción del compuesto A21

Prueba	Agente precipitante	Proporción AP:Plasma	Vol plasma. (mL)	Tiempo de agitación en vortex (min)	Tiempo de reposo (min)	Condiciones de centrifugación (rpm/min)
1	ZnSO <sub>4</sub> 10%	2:1	0.5	2	10	3500/10
2	NaOH 2N	2:1	0.5	2		3500/10
3	MeOH	3:1	0.5	2		3500/10
4	ACN	4:1	0.5	2		3500/10
5	ACN	3:1	0.5	2		3500/10
6	ACN	2:1	0.5	2		3500/10
7	ACN	1:1	0.2	1		14,000/15
8	TCA	0.5:1	0.2	1		14,000/15

### 4.3.3. Evaluación del desempeño del método

#### 4.3.3.1 Selectividad

Se inyectaron por quintuplicado muestras blanco de plasma de: humano (6 individuos diferentes), de ratón (10 machos Hsd:ICR de 7 a 9 semanas de edad) rata (5 machos Wistar de 9-10 semanas de edad), aplicando el método de precipitación de proteínas seleccionado(Tabla 24). Se registró la respuesta y se determinó el porcentaje que corresponde respecto a la concentración de A-21 más baja a evaluar en la curva de calibración (2 µg/mL), aplicando la ecuación 1, cuyo valor deberá ser menor al 20%.



#### *Ecuación 1. %Respuesta del Plasma*

$$\%Respuesta\ del\ Plasma = \frac{Respuesta\ analítica\ de\ plasma * 100}{Respuesta\ analítica\ de\ A - 21(2\ \mu g/mL)}$$

#### **4.3.3.2 Linealidad**

Se prepararon curvas de calibración por triplicado en el rango de concentración de 2 a 20 µg/mL de A-21 en plasma humano y se inyectaron empleando las condiciones cromatográficas seleccionadas (Tabla 20), se determinó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación.

#### **4.3.3.3 Precisión**

##### **4.3.3.3.1 Repetibilidad**

Con los valores de % Coeficiente de variación (%CV) obtenidos a partir de los valores de concentración recuperada para las tres curvas de calibración, se determinó la repetibilidad. El criterio establecido en la NOM-177-SSA1-2013 indica que todas las concentraciones deben tener un %CV menor al 15% (20% en el caso de la concentración más baja de la curva).

##### **4.3.3.3.2 Reproducibilidad**

Se analizaron por triplicado en diferentes días las respuestas analíticas de las curvas de calibración y con el %CV obtenidos a partir de los valores de concentración recuperada para las seis curvas de calibración, se evaluó la repetibilidad en donde el criterio indica que todos los valores deben tener un %CV menor 15% (20% en el caso de la concentración más baja de la curva).



#### 4.3.3.4 Exactitud

A partir de los valores de pendiente e intercepto de cada curva de calibración, se calculó la concentración recuperada. El cálculo de la desviación de la concentración recuperada (%DCR) se determinó empleando la ecuación 2. La NOM-177-SSA-2013 establece que todos los valores de %DCR deben ser menores al 15% (>20% en la concentración más baja), en caso de cumplir este requisito, se dice que el método es exacto.

*Ecuación 2. % Desviación de la concentración recuperada.*

$$\%DCR = \left( \frac{\text{Concentración real} - \text{concentración nominal}}{\text{concentración real}} \right) \times 100$$

#### 4.3.3.5. Recobro

Se preparó una curva de calibración en plasma y una curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.40 [0.05 M] en el rango de 2-20 µg/mL y en ambas se empleó el método de precipitación de proteínas seleccionado (Tabla 24) y se inyectaron empleando las condiciones cromatográficas seleccionadas (Tabla 20), las respuestas analíticas fueron integradas y se calculó el valor de % recobro el cual deberá ser superior al 80% tomando el valor de la solución a pH 7.4 como el 100% de recuperación.

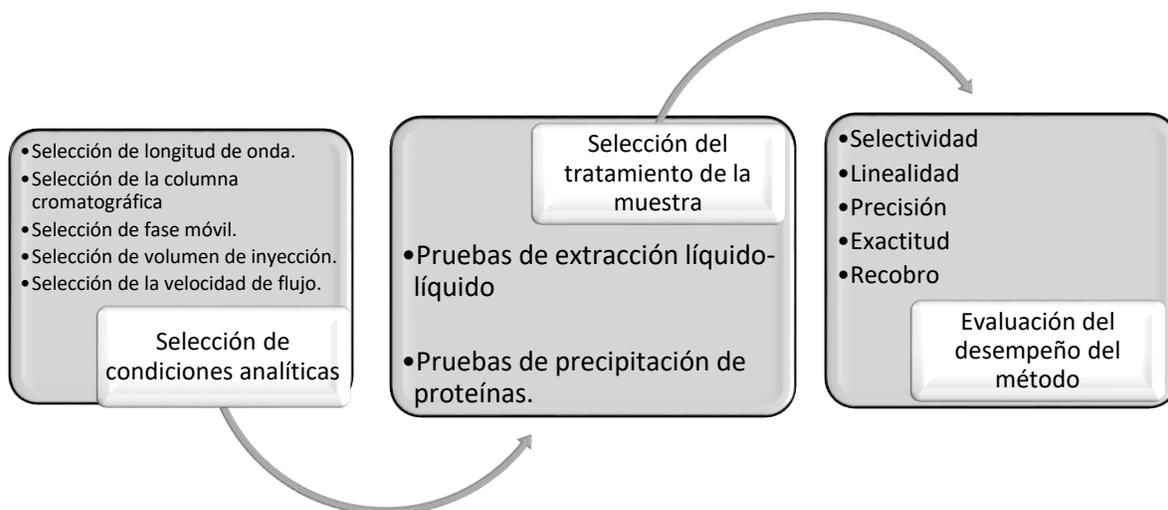
El % de recobro se calculó con la ecuación 3.

*Ecuación 3 % Recobro.*

$$\% \text{ Recobro} = \left| \frac{\text{Respuesta en plasma (mV)}}{\text{Respuesta Buffer pH7.4 (mV)}} \right| \times 100$$



#### 4.4 Diagrama de pruebas a realizar.



Esquema 1. Pruebas a realizar para el desarrollo del método analítico.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Selección de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de análisis

Se realizó el barrido espectrofotométrico de A-21 para seleccionar el pico de absorción más adecuado para la cuantificación de A-21. El barrido se muestra a continuación en la figura 9.

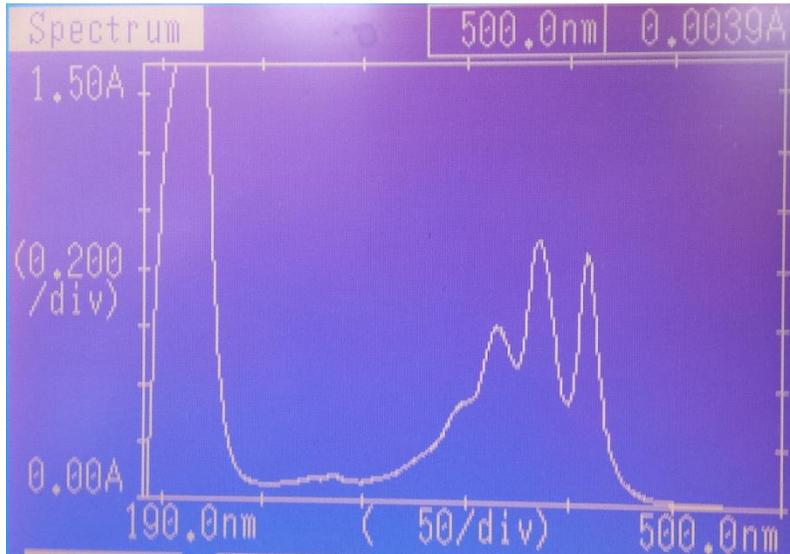


Figura 9. Barrido espectrofotométrico de A-21 [12.5 $\mu$ g/mL] en intervalo de 180nm- 500nm.

Los resultados de absorbancia se presentan en la tabla 15.

Tabla 15.  $\lambda$  de absorción y absorbancia del barrido de A-21.

$\lambda$ absorción(nm)	Absorbancia
409	0.8524
385.5	0.9017
364.5	0.6095
285	0.0902
275.5	0.0796
218	2.0417

Con base en base a los resultados, se seleccionó la longitud de onda de 386 nm ya que fue la que presentó el valor de absorbancia más alto (0.9017). Se descarta la respuesta en 218nm, ya que a pesar de realizar diluciones la respuesta es la misma por lo que se interpreta como una interferencia de la muestra.



## 5.2 Selección de la columna cromatográfica

Los resultados obtenidos al inyectar una disolución de A-21 con concentración de 25 µg/mL en las diferentes columnas, se presentan en la tabla 16. En ella se puede observar que al emplear la columna Zorbax eclipse XDB- C<sub>18</sub> con dimensiones 150 x 4.6mm y 5.0µm de tamaño de partícula de Agilent Technologies se obtuvo la mejor respuesta cromatográfica, por lo que se seleccionó para llevar a cabo el desarrollo del método.

Tabla 16. Respuesta en las diferentes columnas cromatográficas evaluadas para A-21.

Columna	Respuesta (mV)	Tr (min)	Observaciones
Symetry C <sub>18</sub>	71882	0.89	Tiempo de retención muy bajo, poca respuesta analítica en concentración elevada de A-21.
Zorbax Eclipse XDB C <sub>18</sub>	1526712	2.27	Buena simetría del pico cromatográfico, la mejor respuesta analítica, tiempo de retención adecuado, buen ancho de pico.
µBondapack C <sub>18</sub>	835850	4.53	Mejor tiempo de retención y simetría del pico cromatográfico adecuada, poca respuesta analítica y ancho de pico inadecuado debido a que tarda 1.1 minutos en salir por completo, por lo que puede haber cuantificación de picos que no correspondan a A-21
Spherisorb CN-RP	17124	1.68	Muy poca definición, falta de sensibilidad en la respuesta a concentración de A-21 elevada.



## 5.3 Selección de la fase móvil

### 5.3.1 Selección de la proporción Acetonitrilo: Agua

Al evaluar las proporciones indicadas en la tabla 11, se observó que la proporción afecta directamente en la simetría del pico y por tanto, la respuesta de A-21.

En la tabla 17, se muestran las respuestas analíticas de A-21 evaluando diferentes proporciones de agua: acetonitrilo. Con base en los resultados, se seleccionó la proporción 55:45 agua: acetonitrilo por tener la respuesta más alta, sin embargo el ancho del pico no es el adecuado, por lo que se deben modificar los parámetros restantes para tener la mejor respuesta.

Tabla 17. Evaluación de distintas proporciones agua: acetonitrilo.

Proporción agua:acetonitrilo	Respuesta (mV)
30:70	Sin respuesta
45:55	101348
50:50	758873
55:45	793906
60:40	Sin respuesta

### 5.3.2 Selección del pH

Al evaluar diferentes valores de pH de la fase móvil, se observó que A-21 es muy sensible a los cambios de pH, lo cual puede estar asociado a la presencia de los grupos amino, éster e imidazol en su estructura, por lo que el pH es un factor clave para conocer el estado de la molécula (estado ionizado-no ionizado). No se tiene información acerca de los valores de pKa de A-21, pero al llevar el pH por encima de 7.2 o por debajo de 5.0 el pico cromatográfico pierde simetría y altura.

En la tabla 18 se presentan los resultados de respuesta cromatográfica de A-21 en soluciones amortiguadoras (0.05M), en el intervalo de pH de 4.0 a 7.2 utilizando como fase móvil la proporción agua: acetonitrilo 55:45.



Con base en esos resultados se seleccionó el pH 5.0 al mostrar la mejor respuesta analítica comparando con los demás pHs evaluados, así mismo el pico cromatográfico que mostró más definición.

Tabla 18. Evaluación de distintos pH a concentración [0.05 M]

<b>pH</b>	<b>Respuesta (mV)</b>
4.0	Sin respuesta
5.0	1010949
6.0	748014
6.8	772286
7.2	924798

### 5.3.3 Influencia de la presencia de sales en la fase acuosa

Una vez seleccionada la proporción de la fase acuosa y de la fase orgánica, pH y concentración del buffer, se evaluó la presencia del acetato de sodio en el buffer de acetatos 0.05 M Vs una solución de ácido acético [0.05M] ajustada con trietilamina como fase acuosa.

Los resultados se observan en la figura 10, en ambos casos la definición del pico mejora considerablemente y aunque la respuesta con el buffer de acetatos es mayor (920991 mV) respecto a la de la solución de ácido acético (835850 mV), la simetría del pico es mejor en el caso de la solución ácida respecto al buffer y se logra hacer una cuantificación exacta del pico que corresponde a A-21, por lo que se selecciona la solución de ácido acético [0.05M] a pH 5 ajustado con trietilamina como la parte acuosa de la fase móvil.

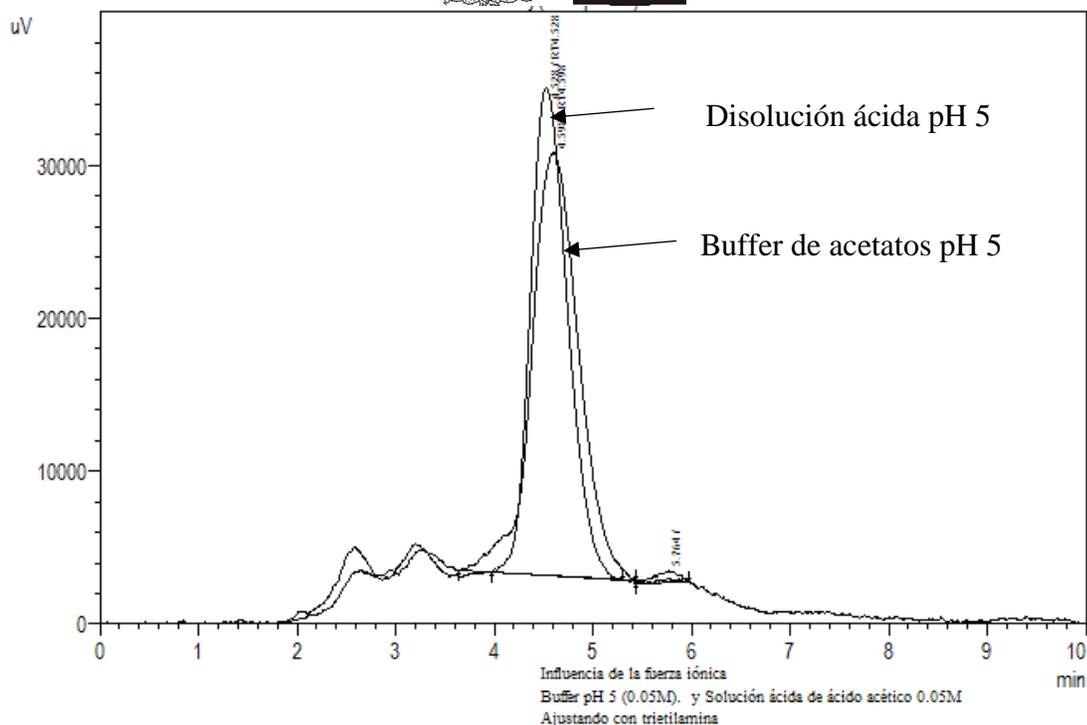


Figura 10. Cromatogramas comparativos de la inyección de A-21 buffer de acetatos pH 5 vs disolución de ácido acético.

#### 5.4 Selección del volumen de inyección

Al realizar los ensayos por triplicado para evaluar la influencia del volumen de inyección, se encontró que, a medida que se aumenta el volumen de inyección, se obtuvo una mejor respuesta, por lo que se seleccionó el volumen de 30  $\mu$ L.

#### 5.5 Selección de la velocidad de flujo

Se realizaron ensayos modificando la velocidad de flujo en el rango de 0.6 a 1.5 mL/min. La figura 11 muestra un cromatograma comparativo de la respuesta en las diferentes condiciones de flujo. Con base en los resultados de la tabla 19 se seleccionó una velocidad de flujo 0.8 mL/min en donde el tiempo de retención es adecuado y el ancho de pico fue igual al obtenido con flujos más altos.

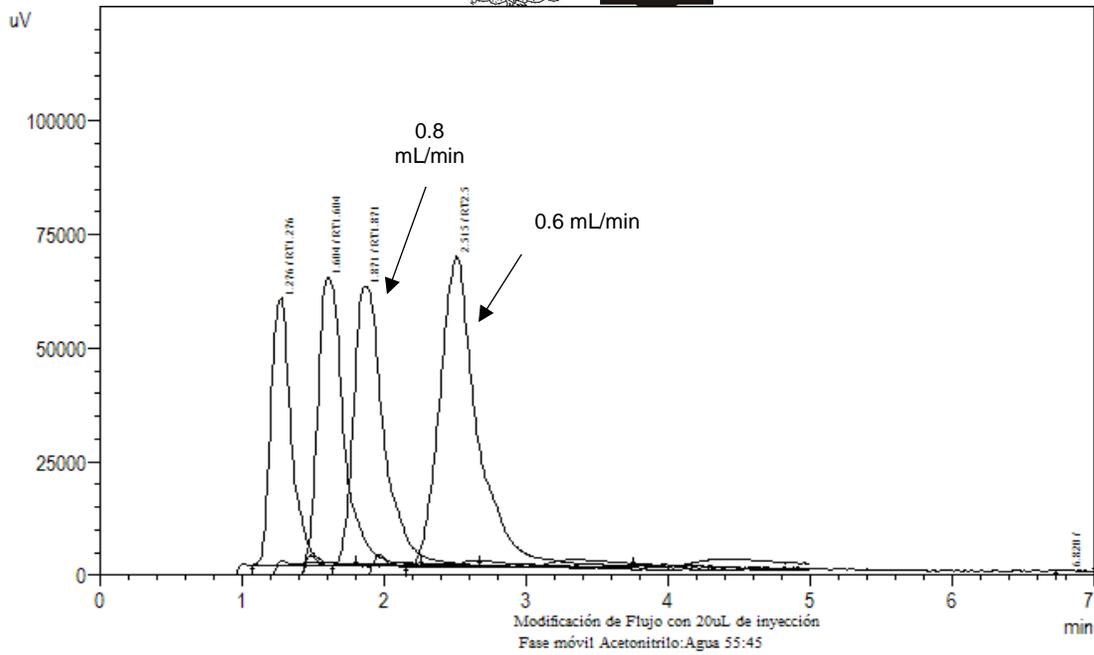


Figura 11. Modificación de velocidad de flujo en el intervalo de 0.6- 1.2 mL/min.

Tabla 19. Tiempo de retención de A-21 vs velocidad de flujo.

<b>Velocidad de flujo (mL/min)</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
0.6	2.515
0.8	1.871
1.0	1.604
1.2	1.276



## 5.6 Resumen de condiciones cromatográficas seleccionadas para el método de cuantificación de A-21

En la tabla 20 se resumen las condiciones analíticas seleccionadas para la cuantificación de A-21 en muestras plasmáticas y en la figura 11 se observa el cromatograma de la inyección de una muestra de A-21 [2µg/mL] al emplear estas condiciones.

Tabla 20. Condiciones analíticas finales para la cuantificación de A-21 en plasma.

Parámetro	Condición
<b>Columna cromatográfica.</b>	Zorbax eclipse XDB- C <sub>18</sub> con dimensiones 150 x 4.6mm y 5.0µm de tamaño de partícula de Agilent Technologies
<b>Fase móvil (%V/V)</b>	55:45 solución de ácido acético [0.05M] a pH 5 ajustado con trietilamina: Acetonitrilo.
<b>Longitud de onda (nm)</b>	386 nm
<b>Velocidad de flujo (mL/min)</b>	0.8
<b>Volumen de inyección (µL)</b>	30
<b>Tiempo final de corrida</b>	5.0
<b>Temperatura de análisis</b>	Temperatura ambiente

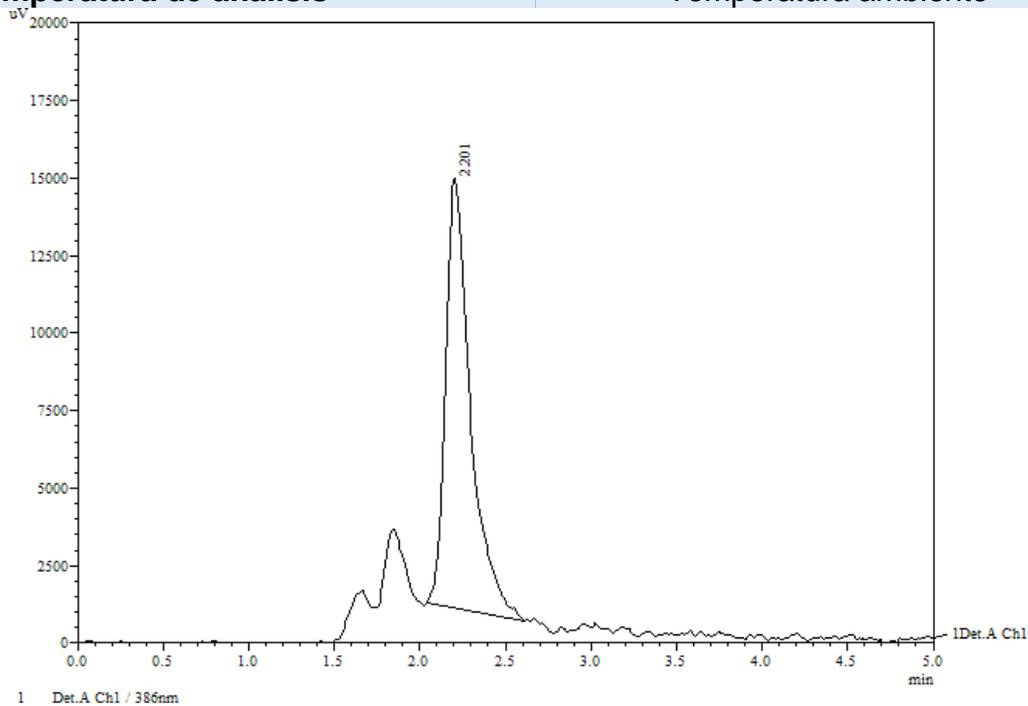


Figura 12. Inyección de A-21 [2µg/mL] bajo las condiciones finales de análisis.



Como se puede observar en la figura 11, se encontraron picos cromatográficos cercanos al pico de A-21, debido a que el producto A-21 contiene impurezas y se observan subproductos de síntesis, sin embargo se evaluó la confiabilidad del método empleando las pruebas de linealidad, exactitud y precisión.

## 5.7 Linealidad del sistema

En la tabla 21 se resumen los resultados de respuesta analítica para las tres curvas de calibración en el sistema, el valor promedio de las tres curvas y el valor de r para cada curva encontrando valores de  $r < 0.99$  que indican que el método presenta una tendencia lineal.

Tabla 21. Valores de área bajo la curva (ABC) mV de las tres curvas de calibración en sistema.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Respuestas de área bajo la curva (mV)			Promedio	D.E.	%CV
2	131413	141920	139979	137771	5590.78	4.06
5	348895	367140	348619	354885	10614.33	2.99
10	680802	709036	684387	691408	15370.88	2.22
15	981045	1032167	1022670	1011961	27191.58	2.69
20	1325039	1335642	1370656	1343779	23872.28	1.78
Valor r	0.9993	0.9988	0.9999	0.9997		

Curva	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)	Coefficiente de correlación (r)
1	65539	11831	0.9993
2	66191	28799	0.9988
3	68154	4459.3	0.9999

En la figura 12 se muestra el gráfico obtenido del promedio de las tres curvas de calibración, junto con la ecuación de la recta y el valor de  $r^2$ .

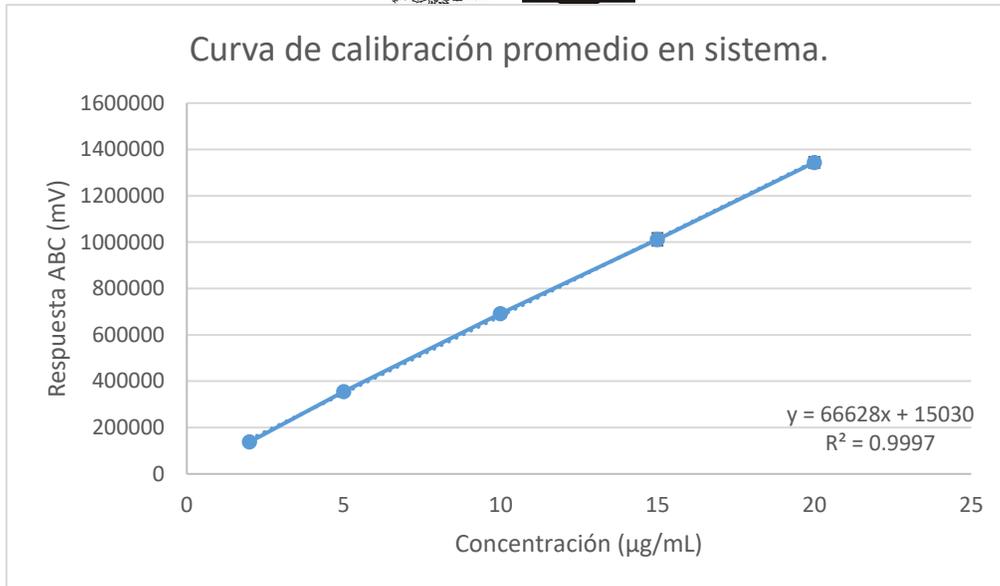


Figura 13. Curva de calibración promedio en sistema (n=3): Intervalo de concentraciones de 2-20 (µg/mL).

## 5.8 Evaluación del método de extracción líquido-líquido

### 5.8.1 Pruebas de solubilidad de A-21

Los resultados mostraron que el análogo de anfotericina es altamente soluble en solventes polares como agua metanol y acetonitrilo, sin embargo se dificulta la solubilidad en solventes no polares. La solubilidad en estos disolventes se presenta en la tabla 22. Los disolventes en los cuales se presentó la mayor solubilidad fueron: Acetato de etilo: 1 mg de A-21/29 mL, Cloruro de metileno: 1 mg de A-21/36 mL y metil terbutil-eter: 1 mg de A-21/98 mL. Por lo que se procedió a realizar las pruebas de extracción líquido-líquido con acetato de etilo (3 mL por prueba).



Tabla 22. Solubilidad cualitativa de A-21 en disolventes inmiscibles en agua.

<b>Disolvente orgánico</b>	<b>Solubilidad respecto al control positivo(agua)</b>
Acetato de etilo.	Presenta coloración.
Cloruro de metileno.	Presenta coloración.
Éter etílico.	Insoluble
Metil ter-butil éter.	Presenta coloración.
Xileno.	Insoluble
1-octanol.	Insoluble
Hexano	Insoluble

### 5.8.2 Pruebas de extracción líquido-líquido con Acetato de etilo

En la tabla 23 se presentan los resultados de respuesta analítica al aplicar el procedimiento descrito en el punto 4.3.2.2. Empleando el método de extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Al analizar los resultados obtenidos se encontró que, a medida que se incrementó el tiempo de agitación las muestras se emulsificaron y cuando el tiempo de agitación era corto, se disminuyó la extracción de A-21. El tiempo y la velocidad que proporcionaron la mejor respuesta fueron 2 minutos a una velocidad de 0.6 de acuerdo a la escala marcada en el vortex. En el caso de la agitación horizontal, los resultados fueron semejantes, a mayor tiempo y velocidad de agitación, las muestras presentaron problemas de emulsificación, lo cual dificultó la limpieza de las muestras para ser inyectadas al cromatógrafo. Ello indica que el método de extracción empleando acetato de etilo, presenta baja afinidad por A-21, el procedimiento es largo, genera residuos tóxicos, es poco reproducible y presenta problemas de emulsificación. Por lo tanto, este método de extracción líquido-líquido fue descartado y se procedió a utilizar el método de precipitación de proteínas.



Tabla 23. Pruebas de extracción líquido- líquido con acetato de etilo.

Prueba realizada					Resultados
# Prueba	Tipo de agitación	Tiempo (min)	Velocidad	Respuesta (mV)	Observaciones
1	Vortex	2	0.5	-----	Sin respuesta.
2		3	0.5	57810	-----
3		2	0.6	67275	Mejor respuesta analítica.
4		3	0.6	43918	1 de 3 muestras emulsificadas
5	A. Horizontal	10	5	46808	-----
6		15	5	81446	Mejor respuesta analítica.
7		20	5	31274	1 de 3 muestras emulsificadas
8		10	6	35906	-----
9		15	6	39241	1 de 3 muestras emulsificadas
10		20	6	-----	2 de 3 muestras emulsificadas
11		10	7	-----	2 de 3 muestras emulsificadas
12		15	7	-----	Muestras emulsificadas
13	20	7	-----	Muestras emulsificadas	
14	Vortex	2	0.7	57527	Respuesta igual a la prueba 3
15	Vortex + A. Horizontal	2 + 10	0.6 + 5	30190	No mejora pruebas individuales

## 5.9. Precipitación de proteínas

### 5.9.1 Pruebas de precipitación de proteínas con diversos agentes precipitantes

Para el estudio se utilizaron diferentes agentes precipitantes y condiciones de tratamiento de la muestra. Los resultados se presentan en la tabla 24.



Tabla 24. Prueba de agentes precipitantes.

Prueba	Agente precipitante	Proporción AP:Plasma	Ventajas	Desventajas
1	ZnSO <sub>4</sub> 10%	2:1	Ninguna	Se precipita el sulfato de zinc por lo que no se puede realizar la inyección al cromatógrafo.
2	NaOH 2N	2:1	Limpieza moderada en la muestra de plasma.	Cambio en el pH de la muestra.
3	MeOH	3:1	Ninguna	Dilución de la matriz. Poca limpieza de la matriz.
4	ACN	4:1	Limpieza total de la matriz.	Dilución de la matriz.
5		3:1	Poca respuesta por parte de la matriz	Dilución de la matriz.
6		2:1	Moderada dilución.	Baja Limpieza de la muestra.
7		1:1	Limpieza al 90% de la muestra, sin respuesta al Tr de A-21	Poco volumen de recuperación para la inyección en el cromatógrafo.
8	TCA	0.5:1	Limpieza total de la muestra. Baja dilución de la muestra.	Cambio en el pH y en la respuesta de A-21

Al evaluar las respuestas, se seleccionó la prueba número 7 que utiliza Acetonitrilo: Plasma 1:1 por los siguientes motivos:

- Limpieza adecuada de la muestra al presentar pocas respuestas detectadas por el cromatógrafo.
- Volumen 1:1 de dilución lo que favorece la sensibilidad del método.
- Micrométodo que requiere de cantidades muy pequeñas de plasma.



- Micrométodo que se basa en la ultracentrifugación de las muestras por lo que logra sedimentar gran cantidad de residuos presentes en las muestras biológicas.
- Tiempos cortos de tratamiento de muestra que no generan residuos tóxicos.
- Alta afinidad del compuesto por la solución que contiene plasma y acetonitrilo.
- Ruptura de la interacción proteína compuesto lo que nos permite la cuantificación en su totalidad del compuesto.
- No se afecta el pH evitando desestabilizar a A-21

La técnica final fue: 200µL plasma: 200µL de acetonitrilo, agitar en vortex durante 1 minuto, dejar reposar 10 minutos y centrifugar a 14,000 rpm/10 minutos.

## 5.10. Evaluación del método

### 5.10.1. Selectividad

Las figuras 14-16 muestran los blancos de tres matrices diferentes: plasma de humano, plasma de rata y plasma de ratón. Para determinar la respuesta cercana al tiempo de retención, se tomó como 100% la respuesta de A-21 en la concentración más baja de la curva de calibración (Figura 17). Los resultados se presentan en la tabla 25. Dado que las respuestas cercanas al Tr de A-21 y su porcentaje de respuesta, no fueron mayores al 20%, se demuestra la selectividad del método.

Tabla 25. Respuestas analíticas por parte de la matriz biológica (humano, rata, ratón) cercanas al tiempo de retención de A-21 (Tr 2.21min)

Muestra	Plasma Humano		Plasma Rata Wistar		Plasma ratón ICR	
	Tr(min)	%Respuesta	Tr(min)	%Respuesta	Tr(min)	%Respuesta
1	2.12	1.1	1.81	12.4	1.81	11.6
2	2.26	0.3	1.84	17.3	1.82	15.7
3	2.25	1.2	1.84	18.2	1.81	11.0
4	2.33	6.0	1.82	15.3	1.82	10.1
5	2.34	6.0	1.75	1.5	1.82	13.2
<b>Promedio</b>	<b>2.26</b>	<b>2.9</b>	<b>1.81</b>	<b>12.9</b>	<b>1.82</b>	<b>12.3</b>

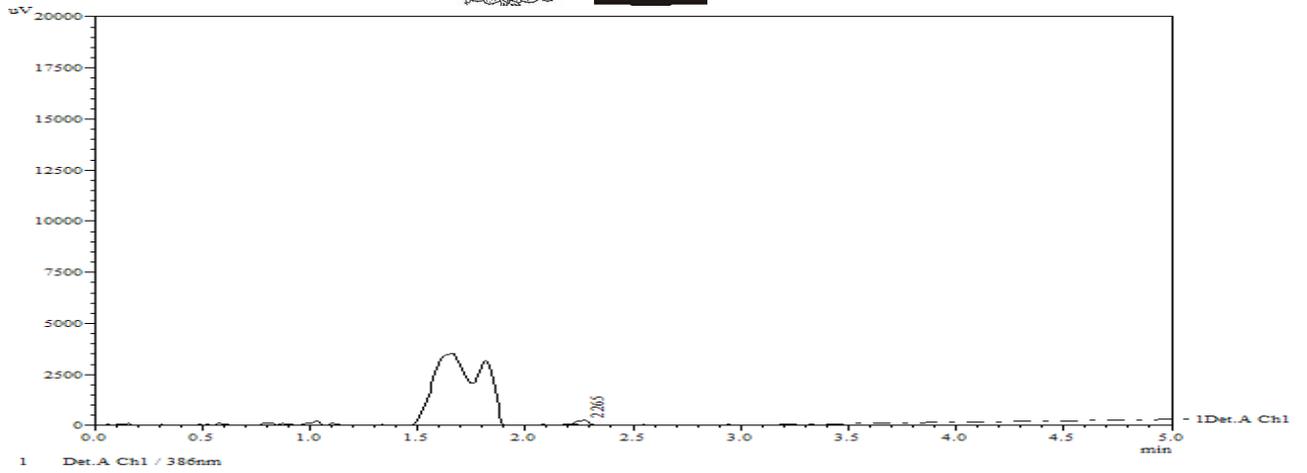


Figura 14. Blanco de precipitación de proteínas plasma Humano.

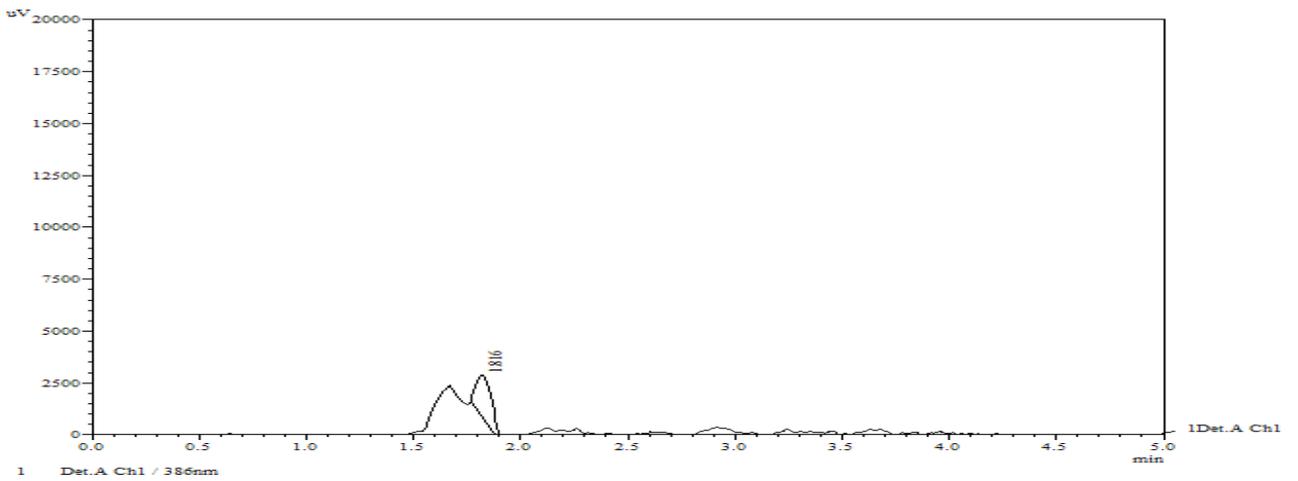


Figura 15. Blanco de precipitación de proteínas de plasma de rata wistar.

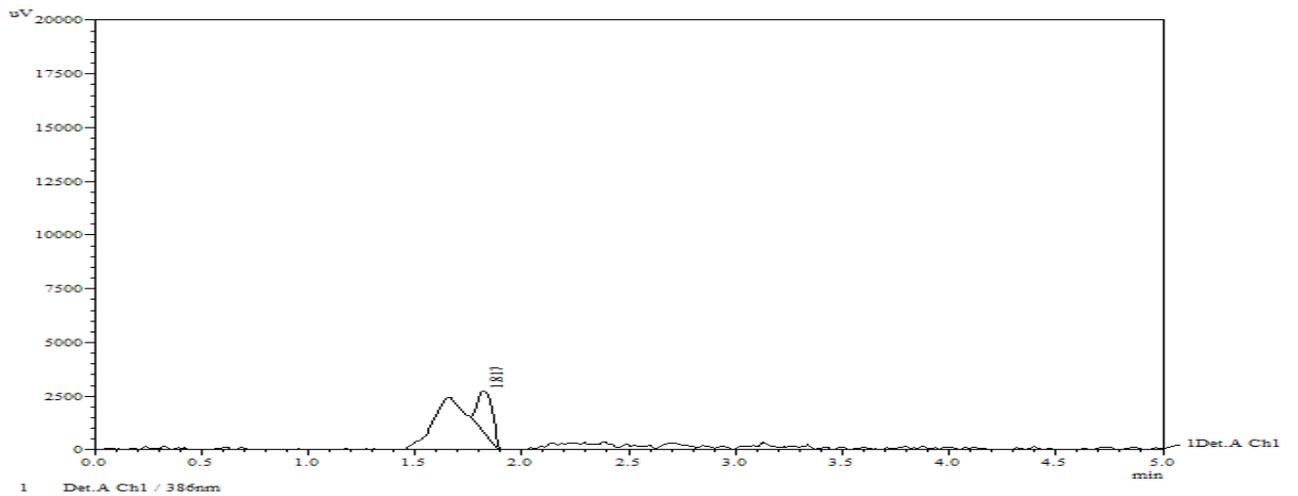


Figura 16. Blanco de precipitación de proteínas de plasma de ratón ICR

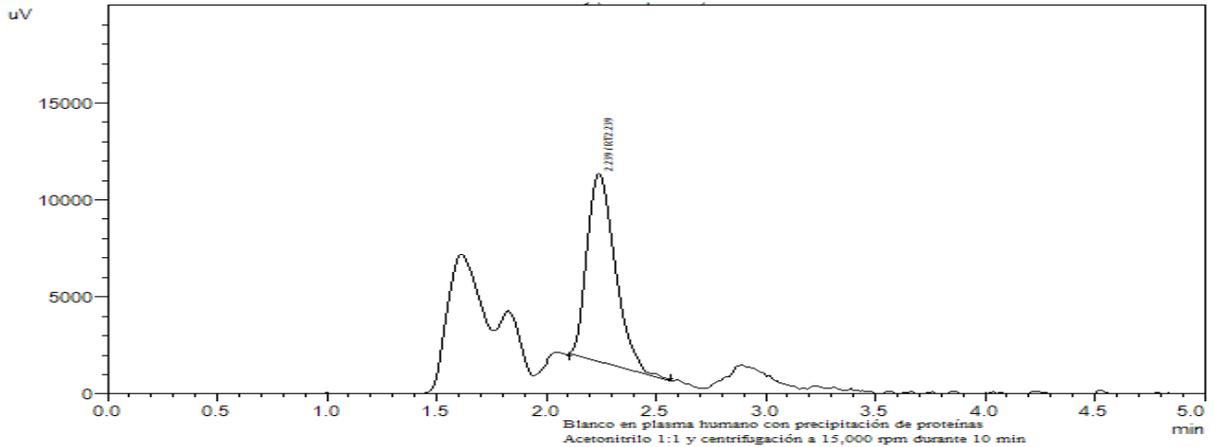


Figura 17. A-21 en plasma humano en concentración de [2 $\mu$ g/mL] muestra tratada con el método de precipitación de proteínas.

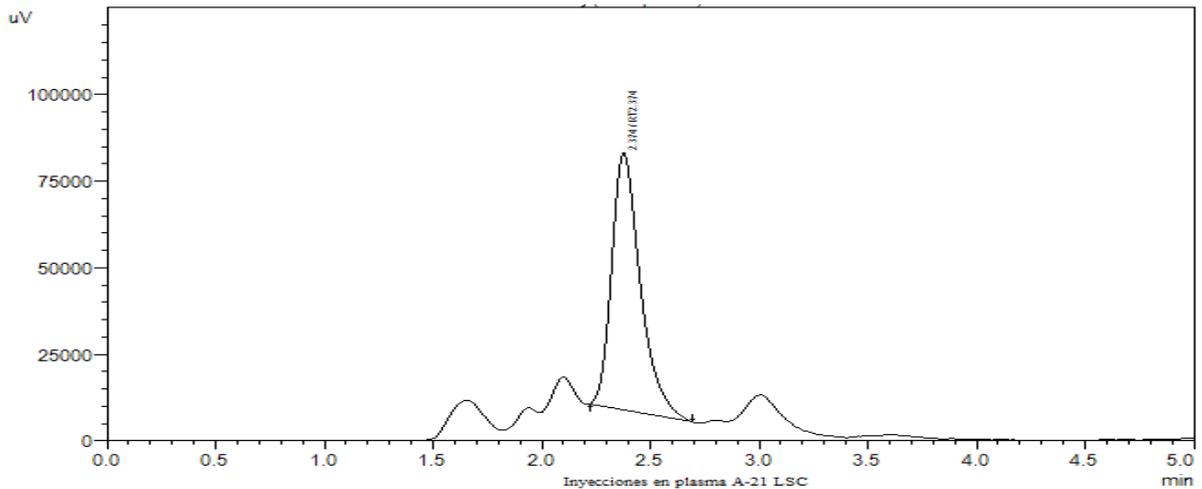
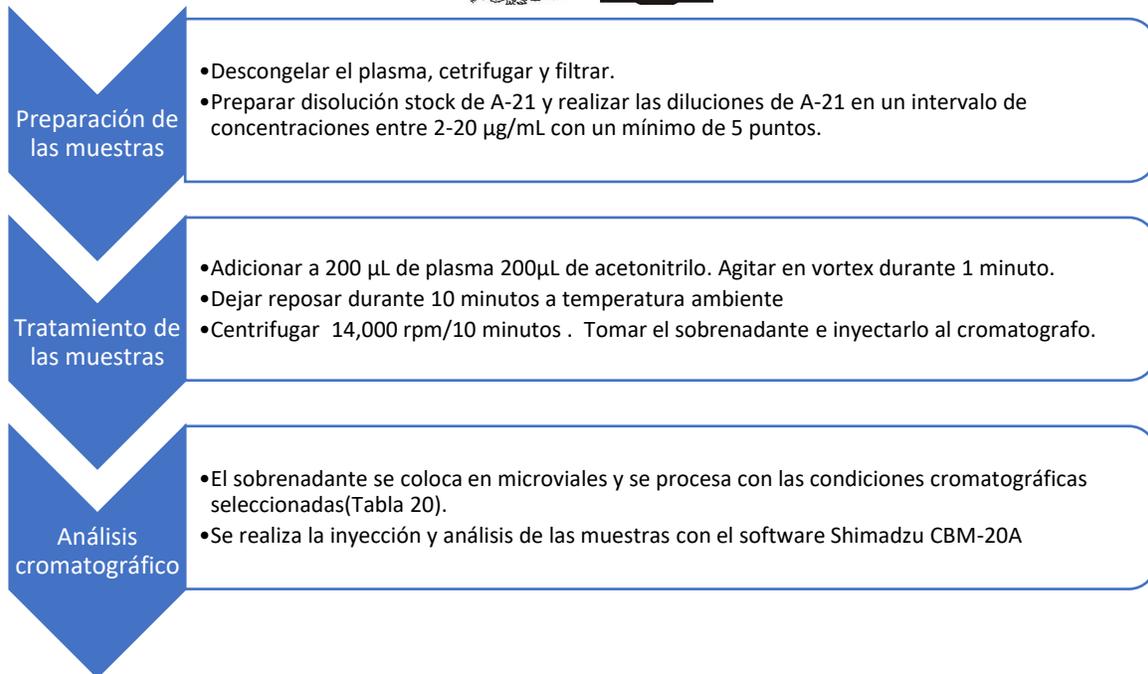


Figura 18. A-21 en plasma humano en concentración de [20 $\mu$ g/mL] muestra tratada con el método de precipitación de proteínas.

En la figura 18 se presenta el cromatograma que corresponde a la concentración de 20  $\mu$ g/mL en el que se observa que no hay interferencia por parte de la matriz en la respuesta de A-21.

A partir de los resultados anteriores se resume en el esquema 2 la preparación de muestras de A-21 en matriz biológica resumido en el esquema 2, dicho tratamiento se aplica para la preparación y procesamiento de las muestras para las pruebas siguientes.



Esquema 2. Tratamiento de muestras de plasma con el método de precipitación de proteínas.

### 5.10.2 Linealidad del método

Se prepararon por triplicado curvas de calibración en plasma, aplicando el método desarrollado. En la tabla 26 se presentan las respuestas analíticas medidas como ABC así como los valores de %CV. En la tabla 27 se presentan los valores de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación.

Con base en los valores obtenidos del coeficiente de correlación ( $r$ ), se demuestra que el método presenta un comportamiento lineal en el rango de concentración evaluado.

La figura 19 representa la curva de calibración generada por el promedio de las tres curvas de calibración en plasma demostrando el comportamiento lineal.



Tabla 26. Resultados de ABC en curvas de calibración de A-21 en plasma

Concentración (µg/mL).	Respuesta de área bajo la curva (mV)			PROMEDIO	D.E.	%CV
2	74277	79574	81926	78592	3917.85	4.99
5	188824	213827	220698	207783	16774.55	8.07
10	401441	426815	427425	418560	14828.91	3.54
15	609515	627924	636044	624494	13592.97	2.18
20	799103	831630	858839	829857	29907.43	3.60

Tabla 27. Valores de regresión lineal en las curvas de calibración.

Curva	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)	Coefficiente de correlación (r)
1	40671	-8343.9	0.9997
2	41643	2866.9	0.9998
3	42776	-121.07	0.9998
Promedio	41696.66667	-1866.02333	0.9998
D.E.	1053.525668	5805.52803	2.8873E-05
%CV	2.526642421	-311.117655	0.00288774

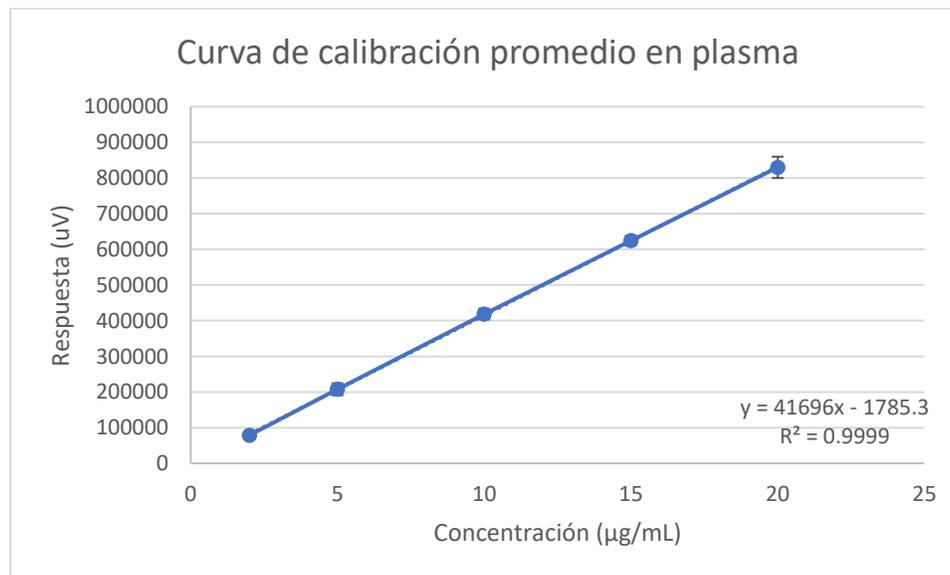


Figura 19. Curva de calibración promedio de A-21 en plasma humano. (n=3).



### 5.10.3 Precisión

#### 5.10.3.1 Repetibilidad

En la tabla 28 se resumen los resultados de %CV obtenidos de la concentración recuperada de las tres curvas de calibración, preparadas en un mismo día.

Tabla 28. Resultados para la prueba de exactitud.

Concentración de A-21 (µg/mL).	Concentración recuperada (µg/mL).			Promedio	Desviación estándar	%CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
2	2.03	1.84	1.91	1.93	0.10	4.99
5	4.85	5.07	5.16	5.03	0.16	3.17
10	10.08	10.18	9.99	10.08	0.10	0.94
15	15.19	15.01	14.87	15.02	0.16	1.07
20	19.85	19.90	20.07	19.94	0.12	0.58

#### 5.10.3.2 Reproducibilidad

Con base en los resultados de concentración recuperada en las curvas de calibración realizadas en tres días diferentes, se calculó el %CV de los seis valores para las curvas de calibración en un rango de concentraciones de 2-20µg/mL. Los resultados se resumen en la tabla 29.

Tabla 29. Resultados de la concentración recuperada de A-21 para la prueba de reproducibilidad.

30/05/2018			11/06/2018	18/06/2018	19/07/2018	Promedio	Desviación estándar	%CV
Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6			
2.03	1.84	1.91	2.64	2.00	2.23	2.11	0.29	13.76
4.85	5.07	5.16	5.46	5.11	4.89	5.09	0.22	4.34
10.08	10.18	9.99	8.77	9.76	9.75	9.76	0.51	5.24
15.19	15.01	14.87	13.78	15.14	15.02	14.83	0.53	3.57
19.85	19.90	20.07	21.35	19.99	20.12	20.21	0.57	2.81



Con base en los valores del %CV para curvas de calibración preparadas en distintas fechas, se demuestra que el método es reproducible al no tener valores por encima del 15% en el %CV, cumpliendo con lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013.

#### 5.10.4 Exactitud

Con base en los resultados de la tabla 27, se realizó el cálculo del % de la desviación de la concentración recuperada (%DCR), de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3.3.4. Con base en los resultados se encontró que todos los valores están por debajo del 15% por lo cual el método cumple con el parámetro de exactitud.

Tabla 30. Resultados %DCR.

Concentración nominal (µg/mL).	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	Concentración Recuperada. (µg/mL).	%DCR.	Concentración Recuperada. (µg/mL).	%DCR	Concentración recuperada. (µg/mL).	%DCR
2	2.03	1.57	1.84	7.90	1.91	4.38
5	4.85	3.04	5.07	1.32	5.16	3.13
10	10.08	0.76	10.18	1.81	9.99	0.11
15	15.19	1.28	15.01	0.07	14.87	0.89
20	19.85	0.73	19.90	0.49	20.07	0.37



### 5.10.5 Determinación del % de recobro

Los resultados de recobro obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3.3.5, se presentan en la tabla 31. Se puede observar que los valores obtenidos se encuentran sobre el 80%, se tomó como 100% la respuesta analítica del buffer a pH 7.4. Los valores de recobro demuestran la correcta recuperación de A-21 aplicando la metodología seleccionada sin presentar interferencias por parte de la matriz biológica.

Tabla 31. Resultados de la prueba para la determinación del porcentaje de recobro

<b>Concentración nominal (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Respuesta en buffer pH 7.4 (mV)</b>	<b>Respuesta en plasma (mV)</b>	<b>% Recobro.</b>
2.0	80804	83228	102.9
5.0	177938	174379	98.1
10.0	314223	341081	106.7
15.0	544646	521367	92.3
20.0	697328	696141	99.8



## 6.0 CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico que demostró selectividad, sensibilidad y linealidad que permite realizar la cuantificación de A-21 en matriz biológica (plasma humano).
- Se demostró que no hay interferencia por parte de la matriz de rata Wistar y ratón ICR.
- El método utiliza una columna cromatográfica Zorbax eclipse XDB- C<sub>18</sub> con dimensiones 150 x 4.6mm y 5.0µm de tamaño de partícula de Agilent Technologies, una fase móvil % conteniendo solución de ácido acético [0.05M] a pH 5 ajustado con trietilamina:acetonitrilo 55:45 a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min.un volumen de inyección 30 µL y longitud de onda de 386 nm.
- El método seleccionado para la extracción fue precipitación de proteínas empleando acetonitrilo en proporción 1:1 con la matriz en volúmenes de 200 µL y ultracentrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos.
- El método fue lineal en el rango de 2-20 µg/mL con un % de recobro superior al 80%



## 7.0 PERSPECTIVAS

- Realizar la validación del método analítico para asegurar la confiabilidad en la estabilidad de A-21 en la matriz biológica, exactitud, precisión y selectividad.
- Aplicar el método desarrollado en estudios de farmacocinética que junto a pruebas preclínicas de toxicidad (aguda, a dosis repetidas, genotoxicidad, teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad) y modelos para demostrar la eficacia nos proporcionen información confiable para poder avanzar la fase clínica.
- Demostrar la equivalencia del método montado en plasma humano con el plasma de rata wistar y ratón ICR.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Spellberg Brad, Powers Jhon, Brass Eric, Miller Loren, Edwards Jhon, Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future Clinical Infectious Diseases 2004; Volume 38:1279–1286.
2. Heymann David L. Resistance to Anti-Infective Drugs and the Threat to Public Health, Cell press 2006, Volume 124 Feb 671-675.
3. Novel Drug Approvals for 2015, U.S. Food and Drug Administration Center of Drug Evaluation and Research, Jan 2016. 15-17.
4. Novel Drug Approvals for 2016, U.S. Food and Drug Administration Center of Drug Evaluation and Research,, Jan 2017. 14-15.
5. Novel Drug Approvals for 2017, U.S. Food and Drug Administration Center of Drug Evaluation and Research, Jan 2018 Consultado. 16/05/18
6. Novel Drug Approvals for 2018, U.S. Food and Drug Administration Center of Drug Evaluation and Research,, May 2018. Consultado. 16/05/18
7. Catalán Mercedes y Montej Juan Carlos. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética, Rev Iberoam Micol 2006; Vol 23 39-43.
8. Drew Richard H, Pharmacology of amphotericin B. UpToDate Jan, 2018. Consultado 16/05/18
9. Bonifaz Trujillo J. A. Micología Médica Básica. Quinta edición, Mc Graw Hill Education. 2015. Pag 637-641.
10. Drugbank: Amphotericin B Consultado 05/09/2018



11. Pavan Balabathula, Dileep R Janagam, Nivesh K Mittal, Bivash Mandal, Laura A Thoma and George C Wood. Rapid Quantitative Evaluation of Amphotericin B in Human Plasma, by Validated HPLC Method. Rev. Bioequivalence & Bioavailability, 2003, Vol 5. pag 121-124.
12. R. Espada, J. M. Josa, S. Valdespina, M. A. Dea, M. P. Ballesteros, J. M. Alunda and J. J. Torrado. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. Rev. BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY Biomed. Chromatogr. 2008 Vol 22. pag 402–407.
13. Ihor Bekersky,\*, Robert M. Fielding, Dawna E. Dressler,†, Jean W. Lee, Donald N. Buell, Thomas J. Walsh, Plasma Protein Binding of Amphotericin B and Pharmacokinetics of Bound versus Unbound Amphotericin B after Administration of Intravenous Liposomal Amphotericin B (AmBisome) and Amphotericin B Deoxycholate , Rev Antimicrob. Agents Chemother. March 2002 Vol. 46 pag 834-840.
14. Echevarría I, Barturen C, Renedo MJ, Dios-Viéitez MC. High-performance liquid chromatographic determination of amphotericin B in plasma and tissue. Application to pharmacokinetic and tissue distribution studies in rats. Journal of Chromatography. Sep 1998, 819(1-2): pag 171-176
15. Wang LH, Smith PC, Anderson KL, Fielding RM. High-performance liquid chromatographic analysis of amphotericin B in plasma, blood, urine and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies. J Chromatogr. 1992 Sep 2; 579(2):pag 259-268.
16. Akkapalli Rajesh, Gangavaram V. M. Sharma, Krishna Damera. Stereoselective synthesis of C1–C12 fragment of amphotericin B. Tetrahedron Letters 2014, Vol. 55 pag 6474–6476



17. Zumbuehl, A.; Stano, P.; Sohrmann, M.; Peter, M.; Walde, P.; Carreira, E. M. A novel strategy for bioconjugation: synthesis and preliminary evaluation with amphotericin B. *Org. Biomol. Chem.* 2006, Vol 5. pag 1339–1342
18. Carmody M, Murphy B, Byrne B, Power P, Rai D, Rawlings B, Caffrey P. Biosynthesis of amphotericin derivatives lacking exocyclic carboxyl groups. *J Biol Chem.* Oct 2005 Vol 41 pag 34420-34426.
19. Naohiro Matsushita, Yukiko Matsuo, Hiroshi Tsuchikawa, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, and Tohru Oishi, Synthesis of 25-<sup>13</sup>C-Amphotericin B Methyl Ester: A Molecular Probe for Solid-state NMR Measurements. *Chemistry Letters* Vol.38, No.2 2009
20. Yuichi Umegawa, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi Michio Murata, Amphotericin B covalent dimers with carbonyl-amino linkage: a new probe for investigating ion channel assemblies, *Tetrahedron Letters*; May 2007, Vol 48. Pages 3393-3396.
21. Davis, S. A.; Della Ripa, L. A.; Hu, L.; Cioffi, A. G.; Pogorelov, T. V.; Rienstra, C. M.; Burke, M. D. J. C3-OH of Amphotericin B Plays an Important Role in Ion Conductance. *Am. Chem. Soc.* 2015, Vol 137, 15102–15104.
22. Szpilman, A. M.; Cereghetti, D. M.; Manthorpe, J. M.; Wurtz, N. R.; Carreira, E. M. Synthesis and Biophysical Studies on 35-Deoxy Amphotericin B Methyl Ester. *Chem. - Eur. Jan.* 2009, Vol 15, 7117–7122.
23. José David Flores-Romero, Josué Rodríguez-Lozada, Manuel López-Ortiz, Ricardo Magaña, Iván Ortega-Blake, Ignacio Regla, and Mario Fernández-Zertuch. Multigram Scale Synthesis of A21, A New Antibiotic Equally Effective and Less Toxic than Amphotericin B. *Org. Process Res. Dev.* 2016, Vol 20, pag 1529–1532.



- 
24. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. Guía de validación de métodos analíticos. 2002, Páginas 1-10.
25. Naidis I., y Turpeinen S. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados en especímenes biológicos. Oficina de las naciones unidas contra la droga y el delito. 2010. Páginas 5-10.
26. Malviya R, Bansal V, Pal O.P. and Sharma P.K. High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. Journal of Global Pharma Technology, 2010; Vol 2 pag: 22-26.
27. Skoog D. West D., Holler J. y Crouch S. Fundamentos de química analítica, novena edición, Cengage Learning Editores, S.A. de C.V. 2005 Páginas 915-932.
28. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_liquida\\_de\\_alta\\_eficacia.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf) Consultado 18/05/18.
29. Moldoveanu S.C., David V. Essentials in modern HPLC Separations. Editorial Elsevier, 2012, paginas 1-14.
30. Introduction to HPLC. Shimadzu LC World Talk Special Issue Volume 1. Consultado 18/05/2018.
31. Gissera G. M. de J. Quintana M., Silva de C. M. del P., Introducción a la cromatografía líquida en alta resolución. Ediciones UAM. 2009. Pag. 11-22



32. Agilent Technologies. Nuevas tendencias en preparación de muestras. Febrero de 2010, consultado 18/05/18 [https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Nuevas%20tendencias%20en%20Extraccion%20en%20Fase%20Solidas%20\(SPE\)-8%20Marzo%20Almiral%20version%202.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Nuevas%20tendencias%20en%20Extraccion%20en%20Fase%20Solidas%20(SPE)-8%20Marzo%20Almiral%20version%202.pdf)
33. CHROM academy, Sample Preparation Liquid/Liquid Extraction Technique.
34. Martha J. M. Wells. Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. 2003 pag 57-70.
35. Jimenez D.I. Tesis Doctoral “Desarrollo de metodología analítica para la determinación de tensoactivos y sus productos de degradación mediante diferentes técnicas separativas.” Universidad de Granada, Facultad de ciencias, Departamento de química analítica. Granada, 2009 pag 135-139.
36. Selective Precipitation of Proteins, (1997) páginas, 1-45.
37. Cara Polson , Pratibha Sarkar , Bev Incedon, Vanaja Raguvaran, Russell Grant. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography– tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography B, 2003, vol 785 pag 263–275.
38. Universidad Autónoma Metropolitana. Precipitación. Planta piloto de fermentaciones. Departamento de biotecnología. <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Precipitacion.pdf> consultado 19/05/18



39. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.

40. Gil Alfonso Magos Guerrero, Marte Lorenzana-Jiménez. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM. Rev Fac Med UNAM Vol. 52 No. 6 Noviembre-Diciembre, 2009.

41. Entidad Mexicana de Acreditación, EMA.  
[http://www.ema.org.mx/portal\\_v3/index.php/ocde](http://www.ema.org.mx/portal_v3/index.php/ocde) Sitio consultado  
10/01/2018.

42. El Programa Marco de Investigación e Innovación de la Unión Europea,  
[https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/sites/horizon2020/files/H2020\\_ES\\_KI0213413ESN.pdf](https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/sites/horizon2020/files/H2020_ES_KI0213413ESN.pdf)

43. Technology Readiness Level, sitio de internet consultado 15/01/2019  
[https://www.nasa.gov/directorates/heo/scan/engineering/technology/txt\\_accordion1.html](https://www.nasa.gov/directorates/heo/scan/engineering/technology/txt_accordion1.html)