



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA EL
ESTUDIO DE UNIÓN DE FÁRMACOS A PROTEÍNAS
PLASMÁTICAS POR DIÁLISIS AL EQUILIBRIO**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

BRENDA JIMENA VELASCO BAZÁN

DIRECTOR:

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD

ASESOR:

DRA. ELIZABETH GUADALUPE SÁNCHEZ GONZÁLEZ



CIUDAD DE MÉXICO, 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.

AGRADECIMIENTO

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto PAPIME PE 208718 “Mejora de la enseñanza y aprendizaje de los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción de fármacos mediante el desarrollo e implementación de materiales educativos innovadores”, por lo que se agradece el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por el apoyo, amor y motivación que me han brindado en todo momento, quienes, con su ejemplo de perseverancia y dedicación, me ayudaron a llegar hasta este momento para seguir cumpliendo mis metas. Gracias.

A mi familia, quienes de alguna manera me han apoyado siempre.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de esta gran institución, en donde adquirí una formación profesional, cultural, crítica, con ejemplo de un fuerte compromiso con la sociedad.

A todo el equipo del Laboratorio de Investigación Farmacéutica, en especial al Dr. Vicente J. Hernández Abad, a la Dra. Elizabeth G. Sánchez González, a la MASS. Cynthia Espinosa Contreras y al Q.F.B. José Ignacio Vázquez, por todo su apoyo, consejo, conocimiento y experiencias compartidas, por la oportunidad de pertenecer al Laboratorio de Investigación Farmacéutica que representa una etapa muy importante de mi formación profesional.

A mis sinodales por las observaciones y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A mis amigos, que siempre me apoyaron y motivaron a seguir adelante, por todos los momentos que hemos compartido.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Proteínas plasmáticas	3
2.1.1. Albúmina	3
2.1.2. Globulinas	4
• α -1-glicoproteína ácida	4
2.1.3. Lipoproteínas	4
2.2. Unión de fármacos a proteínas plasmáticas	4
2.2.1. Efecto de la unión a proteínas plasmáticas en la farmacocinética	9
2.2.2. Uso e importancia	11
• Interacciones fármaco-fármaco	12
• Factores que pueden modificar la unión a proteínas plasmáticas	13
2.2.3. Técnicas para el estudio de la unión de fármacos a proteínas	15
• Ultracentrifugación	15
• Ultrafiltración	16
• Diálisis al equilibrio	16
2.3. Propiedades del fármaco a evaluar	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1. Objetivo general	22
5.2. Objetivos particulares	22
6. DISEÑO DE EXPERIMENTO	23
6.1. Tipo de estudio	23
6.2. Población a estudiar	23
6.3. Criterios de inclusión	23
6.4. Criterios de exclusión	23
6.5. Criterios de eliminación	23
7. MATERIAL Y MÉTODOS	24

7.1. Metodología	27
7.1.1. Diagrama de flujo	27
7.1.2. Desarrollo del método analítico por CLAR	28
7.1.3. Optimización del método analítico	28
7.1.4. Método analítico	29
7.1.5. Validación del sistema	30
• Linealidad del sistema	30
• Precisión del sistema	31
7.1.6. Validación del método analítico	32
• Tratamiento de las muestras	32
• Especificidad	32
• Límite de cuantificación	33
• Linealidad del método	34
• Precisión del método	34
○ Repetibilidad	34
○ Precisión intermedia	35
• Exactitud	35
• Estabilidad de la muestra	35
○ Estabilidad de la muestra a 37 °C	35
○ Estabilidad en el automuestreador	36
7.1.7. Estudio de unión a proteínas	36
• Preparación de la placa base	36
• Tiempo de equilibrio	37
• Grado de unión a proteínas	38
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
8.1. Desarrollo del método analítico	39
8.2. Optimización del método analítico	42
8.3. Validación del sistema	45
8.3.1. Linealidad del sistema	45

8.3.2. Precisión del sistema	47
8.4. Validación del método analítico	48
8.4.1. Especificidad	48
8.4.2. Límite de cuantificación	49
8.4.3. Linealidad del método	50
8.4.4. Precisión del método	53
• Repetibilidad	53
• Precisión intermedia	54
8.4.5. Exactitud	55
8.4.6. Estabilidad de la muestra	56
• Estabilidad a 37° C	56
• Estabilidad en el automuestreador	57
8.4.7. Estudio de unión a proteínas	59
• Tiempo de equilibrio	59
• Grado de unión a proteínas	62
9. CONCLUSIONES	65
10. REFERENCIAS	66
11. ANEXO I. Preparación de soluciones	73
12. ANEXO II. Análisis estadístico	80

1. INTRODUCCIÓN

Una vez que un fármaco es absorbido o administrado en el torrente sanguíneo, este se une a proteínas plasmáticas en diferentes grados. De manera general, esta unión es reversible y existe un equilibrio entre las especies unidas y no unidas a proteínas.

Las proteínas que se encuentran relacionadas con la unión a fármacos son la albúmina, la α -1 –glicoproteína ácida y en menor grado las globulinas, sin embargo, sólo el fármaco no unido a proteínas plasmáticas es capaz de ejercer el efecto farmacológico en el sitio de acción, es decir, el fármaco libre o no unido es el único que se distribuye a tejidos. Es por esto que la unión a proteínas tiene un papel importante en el desarrollo de relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas, en la predicción de interacciones fármaco-fármaco potenciales, en el estudio de la selectividad, potencia y toxicidad al ser evaluados en presencia de proteínas. Debido a la relevancia de éste parámetro, la medida del grado de unión a proteínas se ha convertido en un ensayo de rutina en las etapas tempranas del desarrollo de nuevos medicamentos, particularmente en la evaluación de propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de fármacos candidatos.

Las técnicas que han sido utilizadas comúnmente para la determinación de la unión a proteínas son diálisis al equilibrio, ultrafiltración y ultracentrifugación, de los cuales la diálisis al equilibrio es la técnica utilizada más ampliamente en el área farmacéutica. En la técnica de diálisis al equilibrio se utiliza una membrana semipermeable a través de la cual se separa el fármaco unido y no unido a proteínas plasmáticas, con el subsecuente análisis de estos mediante una técnica analítica adecuada como cromatografía de líquidos de alta resolución.

Tomando en cuenta lo anterior, es importante utilizar un método analítico que sea capaz de determinar la concentración de fármaco unido y no unido a proteínas, tanto de fármacos con porcentajes de unión a proteínas elevados y de aquellos con porcentajes de unión más bajos como sulfametoxazol.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Proteínas plasmáticas

El plasma contiene varias proteínas que funcionan como acarreadores de sustancias endógenas y exógenas en el sistema circulatorio, sin embargo, las proteínas más frecuentemente asociadas con la unión de moléculas de bajo peso molecular en plasma son la albúmina, α -1-glicoproteína ácida y en menor grado globulinas y lipoproteínas.^{1,2}

2.1.1 Albúmina

La albúmina tiene un peso molecular de 67 kDa y una concentración plasmática de 500 a 700 μ M.³ Es la proteína plasmática más abundante, ayuda a mantener a presión osmótica y el pH en el torrente sanguíneo. En el cuerpo, la albúmina está distribuida en el plasma y en fluidos extracelulares de la piel, músculo y otros tejidos. Como transportador de sustancias endógenas, la albúmina forma complejos con ácidos grasos libres, bilirrubina y varias hormonas (como cortisona, aldosterona y tiroxina) triptófano y otros compuestos.⁴ La unión reversible de alta afinidad de un fármaco a proteínas plasmáticas es dictada por las interacciones moleculares específicas entre el fármaco y residuos de aminoácidos que crean el sitio de unión a proteínas. Los compuestos ácidos (aniónicos) tienden a unirse específicamente a albúmina.⁵ En general, el grado de unión a proteínas aumenta con el carácter hidrofóbico del compuesto.⁶ Tiene un alto grado de residuos iónicos por lo que tiene alta solubilidad acuosa, es altamente flexible, lo que resulta en la capacidad de unirse a una gran variedad de moléculas.⁷

2.1.2 Globulinas

Las globulinas (α , β , γ globulinas) pueden ser responsables del transporte de ciertas sustancias endógenas, como los corticosteroides. Estas globulinas tienen una baja capacidad, pero alta afinidad por la unión de estas sustancias endógenas.⁴

Proteínas como la γ -globulina, transcortina, fibrinógeno, globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), globulina fijadora de tiroxina (TBG), se unen a compuestos específicos.³

- **α -1-glicoproteína ácida**

Es la segunda proteína plasmática más importante relacionada con la unión de fármacos a proteínas, tiene un peso molecular aproximado de 42 kDa y una concentración de 9 a 23 μ M bajo condiciones fisiológicas normales.³ Los fármacos que exhiben un comportamiento básico (catiónico) tienden a unirse predominantemente a α -1-glicoproteína ácida.⁵

2.1.3 Lipoproteínas

Son complejos macromoleculares de lípidos y proteínas, son responsables del transporte de lípidos plasmáticos, la unión con fármacos ocurre sólo si los sitios de unión de la albúmina están saturados, es decir, si el fármaco está presente a una concentración muy alta.⁴

2.2 Unión de fármacos a proteínas plasmáticas

La mayoría de los fármacos se unen a proteínas o forman complejos con proteínas por medio de un proceso reversible. La unión reversible implica que el fármaco se une a

proteínas por enlaces más débiles como puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. Los aminoácidos que componen la cadena de la proteína tienen hidroxilos, carbonilos u otros sitios disponibles para interacciones reversibles con el fármaco.

Por otra parte, la difusión pasiva es el principal proceso por el cual la mayoría de los fármacos atraviesan membranas. La difusión pasiva es el proceso por el cual las moléculas del fármaco se mueven a través de una membrana semipermeable en función de un gradiente de concentración, es decir, del área con mayor concentración al área de menor concentración, y es descrita por la ley de difusión de Fick.

$$\text{Tasa de difusión del fármaco} = \frac{dQ}{dt} = \frac{-DKA}{h}(C_p - C_t)$$

En donde $C_p - C_t$ es la diferencia de la concentración del fármaco en plasma (C_p) y en tejido (C_t), respectivamente; A es el área superficial de la membrana, h es el grosor de la membrana, K es el coeficiente de partición lípido/agua y D es la constante de difusión. El signo negativo denota la transferencia neta del fármaco desde el interior del lumen del capilar hacia el tejido y espacios extracelulares.⁴

El paso de un compuesto a través de una membrana determinada se ve afectado, y en ocasiones limitado, por tres propiedades moleculares principales: tamaño, lipofilicidad y carga (o grado de ionización). Estas propiedades, junto con la naturaleza de la membrana y el medio en cada lado de la membrana determinan la velocidad general de movimiento de un compuesto a través de esta.

En primer lugar, el tamaño molecular tiene un gran impacto en el movimiento, de manera que sólo el fármaco libre (no unido) es capaz de difundir a través de las membranas celulares. Las proteínas, y por lo tanto el complejo fármaco-proteína, son

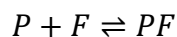
muy grandes para difundir a través de las membranas debido a la rigidez relativa de estas, lo que impide estéricamente el movimiento del fármaco.

En segundo lugar, generalmente, cuanto más lipófila es una molécula, mayor es su permeabilidad, pero como ya se mencionó, el tamaño de la molécula también es importante. Los fármacos pequeños liposolubles y no ionizados tienden a atravesar las membranas lipídicas con facilidad.

En tercer lugar, debido a que la mayoría de los fármacos son ácidos o bases débiles y existen en solución como un equilibrio entre las formas ionizadas y no ionizadas, el aumento de la concentración total de fármaco en el lado de la membrana donde el pH favorece la mayor ionización del fármaco, ha conducido a la teoría de pH reparto. De acuerdo con esta teoría, sólo el fármaco libre (no unido) no ionizado y no polar puede penetrar la membrana y, en el equilibrio, las concentraciones de las especies no ionizadas son iguales en ambos lados, pero las concentraciones totales pueden ser muy diferentes debido al grado de ionización.

El transporte del fármaco continúa hacia el equilibrio, una condición en la cual las concentraciones de la difusión de las especies son iguales en las fases acuosas en ambos lados de la membrana. El movimiento de fármaco entre estas fases continúa en equilibrio, pero el flujo neto es cero. El equilibrio es alcanzado más rápidamente con fármacos altamente permeables, y cuando hay una gran superficie de contacto con la membrana.³

La cinética de unión a proteínas reversible puede ser descrita por la ley de acción de masas.



Donde P y F son la proteína y el fármaco no unido y PF es el complejo fármaco proteína. La extensión del complejo fármaco-proteína formado es dependiente de la constante de asociación K_a que puede ser expresada por la ecuación anterior como la relación entre la concentración molar de los productos y los reactantes.

$$K_a = \frac{(PF)}{(P)(F)} = \frac{1}{K_d}$$

La magnitud de K_a proporciona información del grado de unión a proteínas de un fármaco. Fármacos unidos fuertemente a proteínas tienen un valor de constante de asociación muy grande y existen en su mayoría como fármaco-proteína, con estos fármacos pueden ser necesarias grandes dosis para obtener una concentración terapéutica razonable de fármaco libre.⁴

En la práctica, es más usada la constante de disociación de unión a proteínas plasmáticas (K_d) recíproca a la constante de asociación, por lo tanto, un fármaco de alta afinidad tendrá una K_d baja y se unirá a un número mayor de un receptor particular a una concentración baja que un fármaco que presente baja afinidad. La mayoría de los fármacos muestran una unión independiente de la concentración (lineal) a las proteínas plasmáticas, esto es válido si la concentración molar del fármaco es pequeña (menor que la constante de disociación de unión a proteínas plasmáticas), la fracción ligada estará en función del número de sitios de unión y de la constante de disociación, y el porcentaje de unión a proteínas y la fracción libre son independientes de la concentración y constantes. En caso de haber grandes concentraciones del fármaco (que excedan de la constante de disociación), la fracción ligada estará en función del

número de sitios de unión y de la concentración del fármaco, por lo tanto, la unión a proteínas plasmáticas en este caso se observará como fenómeno saturable y no lineal.^{8,9}

Debido a que el número de sitios de unión en una proteína es limitado, la unión también depende la concentración molar de ambos, del fármaco y de proteínas.³

Conforme la concentración de fármaco libre aumenta, el número de moles de fármaco unido por mol de proteína se satura y se equilibra. Con una concentración de proteínas constante (que normalmente es el caso) sólo un cierto número de sitios de unión están disponibles para un fármaco. A una baja concentración de fármaco, la mayor parte de este puede estar unido a proteínas, mientras que, a altas concentraciones del fármaco, los sitios de unión de las proteínas se empiezan a saturar, con el consecuente incremento de la concentración de fármaco libre (no unido).⁴

De acuerdo con la hipótesis del fármaco libre, la actividad farmacológica es determinada por la concentración del fármaco libre en el sitio del objetivo terapéutico.¹⁰

La concentración total del fármaco es tanto la concentración del fármaco unido y no unido a proteínas, es decir:

$$C_{Total} = C_{unido} + C_{Libre}$$

Donde C_{Total} es la concentración total de fármaco en plasma, C_{unido} es la concentración de fármaco unido a proteínas y C_{Libre} es la concentración de fármaco libre (no unido).¹¹

El grado de unión es frecuentemente expresado como la relación de concentración de fármaco unido y total en plasma, sin embargo, como se mencionó antes, la

concentración libre de fármaco es de mayor importancia que la concentración total en terapéutica. La fracción de fármaco no unido (f_L) es expresada por la relación entre la concentración de fármaco no unida (C_{Libre}) y la concentración total de fármaco en plasma (C_{Total}):³

$$f_L = \frac{C_{Libre}}{C_{Total}}$$

Es importante tener en cuenta que la fracción libre (f_L) conceptualmente es diferente de la concentración de fármaco libre, ya que en ocasiones genera confusiones cuando los dos términos se usan de manera indistinta.¹²

El porcentaje de fármaco unido es frecuentemente usado para describir la extensión del fármaco unido a proteínas plasmáticas. Generalmente, un fármaco es considerado altamente unido a proteínas plasmáticas cuando la fracción unida excede el 90 % de la concentración total del fármaco.^{4, 13}

$$\% Unido = \frac{C_{unido}}{C_{Total}} \times 100 = \frac{C_{Total} - C_{Libre}}{C_{Total}} \times 100$$

2.2.1 Efecto de la unión a proteínas plasmáticas en la farmacocinética

La unión a proteínas plasmáticas incluyendo albúmina y glicoproteína puede limitar la concentración del fármaco disponible para actuar en el receptor objetivo o enzima. Esto, junto con varias implicaciones farmacocinéticas de la unión a proteínas plasmáticas, incluido el impacto en el volumen de distribución y el aclaramiento, aumenta la importancia de este parámetro al evaluar y optimizar la farmacocinética, eficacia y seguridad de un fármaco.¹⁴ Además de la distribución, la unión a proteínas plasmáticas también afecta otros procesos farmacocinéticos, como el metabolismo y la eliminación

de fármacos; de hecho, tanto la captación hepática como la filtración glomerular son directamente proporcionales a la fracción de fármaco libre presente en el plasma.^{8-9, 15}

El volumen de distribución aparente de un fármaco (V_d) da una idea del grado de unión y distribución del fármaco. Los fármacos altamente unidos a proteínas plasmáticas generalmente tienen un V_d bajo, debido a que su fuerte asociación con las proteínas del plasma lo confina en el espacio vascular mientras que, en los fármacos que se encuentran libres ampliamente en plasma, es decir fármacos con un porcentaje de unión a proteínas bajo, generalmente están disponibles para su distribución a los tejidos se espera un V_d más grandes.^{4, 9}

El aclaramiento de los fármacos del cuerpo puede ser influenciado por la extensión de la unión a proteínas, pero la tendencia dependerá de la ruta de eliminación. El fármaco unido a proteínas no puede experimentar filtración glomerular, por lo que sólo el fármaco no unido puede ser filtrado, lo que puede prolongar la vida media de fármacos que no son secretados activamente por los túbulos renales y que no se metabolizan rápidamente. Mientras que, si un fármaco unido a albúmina está sujeto a secreción renal activa, la unión no suele ser un factor limitante; de hecho, tiende a promover la excreción al retener el fármaco en el torrente sanguíneo para su entrega al sistema excretor.¹⁵ Es decir, el fármaco unido a proteínas no estará disponible como sustrato para las enzimas del hígado, de manera que se reduce su tasa metabólica. De manera general, los fármacos unidos a proteínas tienen un aclaramiento total reducido.⁴

Si un fármaco tiene una alta unión a proteínas y un coeficiente de extracción hepática alto, las proteínas plasmáticas actúan como un sistema de entrega, mientras que, si un

fármaco tiene un coeficiente de extracción hepática baja, el metabolismo puede verse disminuido por la alta unión a proteínas.^{9,15}

Por otro lado, el complejo fármaco-proteína puede servir como un depósito, que puede reponer la concentración libre del fármaco después del proceso de eliminación. Como consecuencia, puede prolongar la actividad de un fármaco que puede ser deseable o puede conducir a la aparición de reacciones adversas.¹⁶

Los cálculos realizados por Gillete,¹⁷ que indican que, si la velocidad de eliminación de un fármaco está limitada por el flujo de sangre a través del hígado, cuando un fármaco esté unido un 50 % a la albúmina, su semivida se prolongará un 11 %; cuando el fármaco está combinado en un 75 % a las proteínas plasmáticas, la semivida se prolongará en un 33%. Estos datos demuestran que, terapéuticamente, la prolongación de la semivida adquiere importancia real cuando el porcentaje de unión a proteínas es del 90 % o mayor.¹¹

2.2.2 Uso e importancia

La unión a proteínas plasmáticas es un parámetro ampliamente utilizado en el desarrollo de relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas, en la predicción de interacciones fármaco-fármaco y en la evaluación de la toxicidad de candidatos a fármacos.^{10, 18} Es un parámetro clave en la predicción de parámetros farmacocinéticos como el volumen de distribución y el aclaramiento, así como en la predicción de dosis clínicas.^{19, 20}

En los últimos años se ha observado una demanda creciente en la necesidad de contar con la medida de unión a proteínas plasmáticas en el descubrimiento de fármacos, y se

ha convertido en un ensayo de rutina en las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de posibles candidatos a fármacos.²¹ La unión a proteínas de los candidatos a fármacos puede ser medida por experimentos *in vitro*, empleando plasma de múltiples especies. La comparación de la fracción libre entre diferentes especies, a lo largo de un rango de concentraciones es de utilidad en la interpretación de los resultados preclínicos de la farmacocinética y farmacodinamia.²²

Para candidatos a fármacos, es esencial considerar este parámetro en la predicción de la farmacocinética en humanos utilizando datos de experimentos *in vitro*. Hay una gran cantidad de fármacos en el mercado con unión a proteínas muy alto, y las tendencias indican que el porcentaje de medicamentos con unión a proteínas superior al 99% va en aumento.²³

- **Interacciones fármaco-fármaco**

En algunos casos, las moléculas de fármaco pueden ser desplazadas de las proteínas plasmáticas por la coadministración de fármacos y por sustancias endógenas como ácidos grasos, bilirrubina, hormonas, entre otras, lo cual puede resultar en un incremento en la concentración de fármaco libre. El desplazamiento del fármaco y las consecuencias clínicas serán por lo tanto un proceso dinámico y dependerán de la tasa de eliminación y del índice terapéutico del fármaco.²²

Como resultado, un aumento en la concentración del fármaco libre puede o no ser biológicamente relevante. Benet y Hoener²⁴ concluyeron que la exposición al fármaco no unido no se altera significativamente por los cambios en la unión a proteínas, con

excepción de los fármacos con un coeficiente de extracción alto administrados intravenosamente.²⁵

Los cambios en la concentración de fármaco libre serán clínicamente relevantes cuando el fármaco sea administrado intravenosamente, tenga un coeficiente de extracción alto y sea eliminado principalmente por metabolismo hepático, también en fármacos administrados oralmente, que tienen un coeficiente de extracción alto y en los que el hígado no es la principal ruta de eliminación sistémica, aunque este último caso es menos frecuente.²⁴

- **Factores que pueden modificar la unión a proteínas plasmáticas**

Se sabe que, en la práctica clínica, la unión a proteínas puede variar en diferentes estados fisiológicos y patológicos, lo que representa una fuente potencial de variabilidad en la eficacia clínica como edad, sexo, embarazo, estado de nutrición, dieta, estado de hidratación, pH sanguíneo, administración de diferentes medicamentos y por diferencias genotípicas y fenotípicas del metabolismo.^{14, 22, 23}

La unión a proteínas puede verse afectada por variaciones en el pH del plasma como en casos de severa acidemia y alcalemia.²⁶

Una característica notable de la insuficiencia renal y hepática avanzada es un cambio en la unión a proteínas plasmáticas de algunos fármacos, lo que se puede atribuir a diferentes factores como la disminución en la concentración de proteínas plasmáticas como resultado de una disminución en la síntesis de proteínas, así como por la competencia los sitios de unión a proteínas por la acumulación de sustancias endógenas.²⁷⁻²⁹

En general, los cambios en la unión a proteínas sólo tienen un impacto en la exposición de fármaco libre mínima con excepción de los fármacos con las características mencionadas anteriormente sin embargo, un número de propiedades farmacocinéticas se pueden ver afectadas en pacientes con daño hepático y renales por lo que puede ser necesario el ajuste de dosis; es importante medir con precisión la unión a proteínas para comprender completamente los posibles cambios en la farmacocinética en estas poblaciones especiales.²³

Durante la inflamación y edema, el balance osmótico puede ser alterado, resultando en el flujo de agua plasmática al espacio intersticial; esto puede ser parcialmente explicado porque hay un incremento en la distribución extravascular de fármacos durante algunos estados patológicos.⁴

Los cambios en la unión a proteínas debido a estados patológicos son de importancia clínica principalmente para un subgrupo de fármacos con alta tasa de eliminación con índice terapéutico estrecho y que se administran por vía intravenosa.²⁴ Cuando ocurren cambios en la unión a proteínas plasmáticas, el fármaco libre se equilibra con rapidez en todo el cuerpo y ocurrirán cambios significativos transitorios en la concentración de fármaco no unido a proteínas plasmáticas. Así, las concentraciones plasmáticas de fármacos no unidos a proteínas mostrarán cambios significativos sólo cuando ocurran alteraciones en la entrada o eliminación del fármaco libre como consecuencia del metabolismo o transporte activo.⁸

2.2.3 Técnicas para el estudio de la unión de fármacos a proteínas

Las técnicas más comúnmente utilizadas son diálisis al equilibrio, ultrafiltración y ultracentrifugación. Estos se basan en la separación física y en la medida de fármaco unido y no unido a proteínas. De manera general, los compuestos a analizar por diálisis al equilibrio y por ultrafiltración deben ser solubles en la solución amortiguadora de diálisis y exhibir unión no específica mínima durante el experimento; otros factores como la resolución del ensayo, la facilidad de uso y el rendimiento deberían ser considerados al decidir qué método es el más apropiado. En todas las técnicas de separación, las medidas precisas y exactas dependen del establecimiento y mantenimiento las condiciones de equilibrio durante el proceso de separación. Independientemente de la técnica seleccionada, es necesario controlar las condiciones de pH y temperatura para establecer las condiciones de equilibrio, para simular las condiciones fisiológicas;²² al adicionar soluciones Stock que contienen disolventes a la matriz de ensayo, la concentración final de disolvente debe mantenerse lo más baja posible para no afectar las interacciones de unión a proteínas.³⁰

Las mediciones de la unión fármaco-proteína deben obtenerse en un amplio rango de concentraciones del fármaco ya que, a baja concentración del fármaco, podría perderse una alta afinidad o a una alta concentración del fármaco, puede ocurrir la saturación de los sitios de unión a proteínas.⁴

- **Ultracentrifugación**

Este método utiliza fuerzas gravitatorias altas (65,000 g) para separar el fármaco libre del fármaco unido. Después de la centrifugación, el fármaco unido asociado con

macromoléculas plasmáticas de alta densidad como albúmina, α -1- glicoproteína ácida, otras proteínas en el plasma y lipoproteínas sedimentan en el fondo del tubo mientras que las lipoproteínas de muy baja densidad y quilomicrones flotan en la superficie del tubo. La concentración del fármaco libre se determina tomando una muestra del área debajo de la capa lipídica, mientras que la concentración total de fármaco se determina antes de la centrifugación; en donde una de las principales desventajas reportadas es la posible contaminación por proteínas o lipoproteínas en la capa del fármaco libre, lo que toma mayor importancia en el análisis de fármacos altamente unidos a proteínas.²²

- **Ultrafiltración**

En este método se utiliza un dispositivo de dos cámaras separadas por una membrana semipermeable; la solución de muestra se coloca en la cámara superior, se centrifuga para mover el fármaco libre de la cámara superior a la inferior. La ultrafiltración es un método rápido y sencillo, sin embargo, la mayor desventaja de este método es la unión no específica del fármaco libre a la membrana o a todo el dispositivo, lo que puede ocasionar una subestimación de la concentración del fármaco libre, durante el proceso de ultrafiltración, es más difícil controlar la temperatura y el pH.²²

- **Diálisis al equilibrio**

El método de diálisis al equilibrio es el más utilizado en la industria farmacéutica, es considerado como el método de referencia para la determinación de la unión a proteínas plasmáticas y a tejidos en etapas tempranas de desarrollo y descubrimiento de fármacos ya que la unión no específica (unión a los pocillos del dispositivo y a la membrana de diálisis) tiene un impacto mínimo en los resultados.^{20, 23, 31}

Se utiliza un dispositivo de dos compartimientos separados por una membrana semipermeable. La solución de proteínas conteniendo el fármaco de análisis es depositado en una cámara y una solución amortiguadora se adiciona a la cámara opuesta. El fármaco no unido a proteínas pasa a través de la membrana, la cual es impermeable tanto a las proteínas unidas al fármaco como a las proteínas no unidas. Cuando el equilibrio es alcanzado, la concentración de fármaco libre será igual en ambos lados de la membrana, mientras que el fármaco unido a proteínas permanecerá en la cámara de las proteínas; se toma una muestra de la concentración del fármaco total del lado con solución de proteínas mientras que la concentración del fármaco libre es determinada con una muestra de la cámara con solución amortiguadora. Para este método, el formato de dispositivos de 96 pocillos, compuestos de cilindros verticales permiten realizar más fácilmente el análisis, produciendo resultados más rápidos y reproducibles.²²

Un ejemplo de este formato de dispositivos es el dispositivo RED (Rapid Equilibrium Dialysis, ThermoFisher Scientific), emplea una placa base e insertos con dos compartimientos con una membrana de diálisis con mayor área de superficie, que ofrece el potencial de reducir la preparación y el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. El tiempo de incubación típico en los dispositivos de diálisis es de 4-6 h.¹⁴ Además, para este formato, se ha reportado que el volumen de intercambio entre compartimientos es despreciable, bajo las condiciones típicas de análisis.^{12, 14, 20}

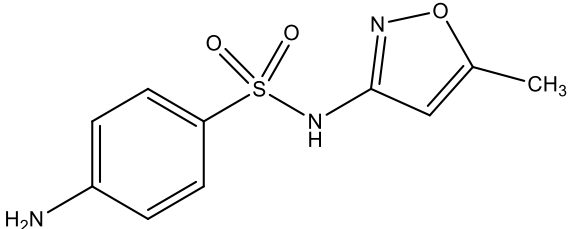
Si bien los resultados confiables y reproducibles se logran de manera rutinaria con este método, su uso puede representar un reto debido a las propiedades fisicoquímicas del compuesto de prueba, así como para compuestos con alto peso molecular, muy

lipofílicos, insolubles o con elevada unión no específica.^{12, 22} Sin embargo, se han implementado exitosamente variaciones del método de diálisis al equilibrio por muchas compañías farmacéuticas.^{12, 23}

Como se mencionó anteriormente, la unión a proteínas plasmáticas es un parámetro que se determina principalmente en las etapas de descubrimiento y desarrollo de posibles candidatos a fármacos para el estudio de las propiedades ADME; debido a la importancia de este parámetro, es de gran importancia seleccionar el método adecuado para el estudio de unión a proteínas de acuerdo a las características de los fármacos a evaluar así como contar con un método analítico capaz de cuantificar bajas concentraciones de fármaco ya que es de gran relevancia para fármacos altamente unidos a proteínas es decir, con un porcentaje de unión mayor al 90%.

2.3 Propiedades del fármaco a evaluar

Tabla 1. Propiedades físicas, químicas y unión a proteínas del fármaco a emplear.³²⁻³⁴

FÁRMACO	SULFAMETOXAZOL
Estructura	
Peso molecular (g/mol)	253.3
Solubilidad en agua	Casi insoluble
pKa	5.6
LogP (o/w)	0.9
Absorción UV máx.	265 nm (ác)
% Unión a proteínas	70

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en cuenta que la unión a proteínas tiene efecto en la disposición de un fármaco y la relevancia de este parámetro en el desarrollo de relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas, en la predicción de interacciones fármaco-fármaco y en la evaluación de la toxicidad de fármacos y de candidatos a fármacos en etapas tempranas de desarrollo, y de la variabilidad biológica entre sujetos y grupos poblacionales de estudio, es fundamental contar con un procedimiento capaz de proporcionar datos confiables de la capacidad de enlace a proteínas plasmáticas de fármacos con porcentajes de unión variables. A pesar de que la técnica de diálisis al equilibrio es considerada como una técnica de referencia en los estudios de unión a proteínas y es conocido por ser confiable para la mayoría de los compuestos en una amplia gama de estructuras y propiedades fisicoquímicas diversas, su estandarización representa un reto para los laboratorios donde se realizan dichas determinaciones.

Por lo anterior, es necesario llevar a cabo un estudio que permita la eficaz implementación de esta metodología en el Laboratorio de investigación Farmacéutica de la FES Zaragoza, con la finalidad de utilizarlo en pruebas posteriores relacionadas con los procesos de transporte de fármacos en diferentes modelos. Para la estandarización de la metodología, pueden utilizarse fármacos modelo, como es el caso de sulfametoxazol.

4. HIPÓTESIS

Al obtener los resultados de los estudios de unión a proteínas plasmáticas de sulfametoxazol por el método de diálisis al equilibrio, se podrá implementar la metodología estandarizada para posteriores estudios a este respecto dentro del Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la FES Zaragoza.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estandarizar la metodología para determinación del grado de unión a albúmina por el método de diálisis al equilibrio dentro del Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la FES Zaragoza.

5.2 Objetivos particulares

- Desarrollar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de alta resolución (CLAR) capaz de determinar la concentración de fármaco libre y total para su aplicación a estudios de unión a proteínas plasmáticas.
- Determinar los parámetros de la técnica, y sus valores óptimos, para el correcto desarrollo de la prueba
- Determinar el grado de unión a albúmina del fármaco a emplear mediante diálisis al equilibrio.

6. DISEÑO DE EXPERIMENTO

6.1 Tipo de estudio

Descriptivo, experimental, transversal, prospectivo.

6.2 Población a estudiar

Muestras de sulfametoxazol preparadas en solución de albúmina de huevo, elaboradas en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

6.3 Criterios de inclusión

Muestras de sulfametoxazol en albúmina preparadas el mismo día de análisis.

Muestras de diálisis al equilibrio obtenidas con el dispositivo RED de la marca Thermo Scientific.

6.4 Criterios de exclusión

Muestras contaminadas.

Muestras que no sigan las condiciones de preparación y tratamiento establecidas.

6.5 Criterios de eliminación

Fallas eléctricas que afecten las condiciones establecidas para el estudio.

Muestras tomadas en diferentes tiempos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 2. Material general.

Material	Marca
Vasos de precipitados	Pyrex, Kimax
Matraces aforados	Pyrex, Kimax
Matraces Erlenmeyer	Kimax
Probetas graduadas	Kimax
Material para filtración a vacío	Milli-Q, Millipore
Micropipetas	Socorex, Eppendorf
Puntas para micropipeta	
Tubos Eppendorf	-
Gradilla para tubos Eppendorf	-

Tabla 3. Equipos e instrumentos.

Equipos e instrumentos	Marca	Modelo/Número de serie
Potenciómetro	Hanna instruments	HI 2210
Parrilla de agitación	Thermolyne	
Sonicador	Branson	3800
Vórtex	Thermolyne	Maxi Mix Plus
Bomba de vacío	Arsa	AR-1500L
Microcentrifua	Eppendorf	5417C

Tabla 3. Continuación. Equipos e instrumentos

Equipos e instrumentos	Marca	Modelo/Número de serie
Estufa	Quincy Lab	
Agitador vórtex para microplacas	Scientific Industries	Genie, SI-0400
Microbalanza	Mettler Toledo	MT5
Balanza analítica	OHAUS	Explorer Pro
Equipo de filtración de agua	Millipore	Milli-Q
Espectrofotómetro	Varian	Cary 50 Bio
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	Hitachi	Primaide
<ul style="list-style-type: none"> • Inyector • Detector UV • Bomba • Columna C₁₈ 		Primaide 1210 Primaide 1410 Primaide 1110 LC Phenomenex Luna 5 µm, 150 x 4.6 mm
Equipo para diálisis al equilibrio RED (Rapid Equilibrium Dialysis)	Thermo Scientific	
<ul style="list-style-type: none"> • Placa base de teflón reusable • Herramienta para remover los insertos • Cinta de sellado 		Ref 89811/Lot SI2452352 Ref 89812/Lot SJ2460593 Ref 15036/Lot SI254420

Tabla 3. Continuación. Equipos e instrumentos

Equipos e instrumentos	Marca	Modelo/Número de serie
<ul style="list-style-type: none"> • Insertos para diálisis al equilibrio RED (8KMWCO) 		Ref 89810/Lot SE2392541

Tabla 4. Reactivos.

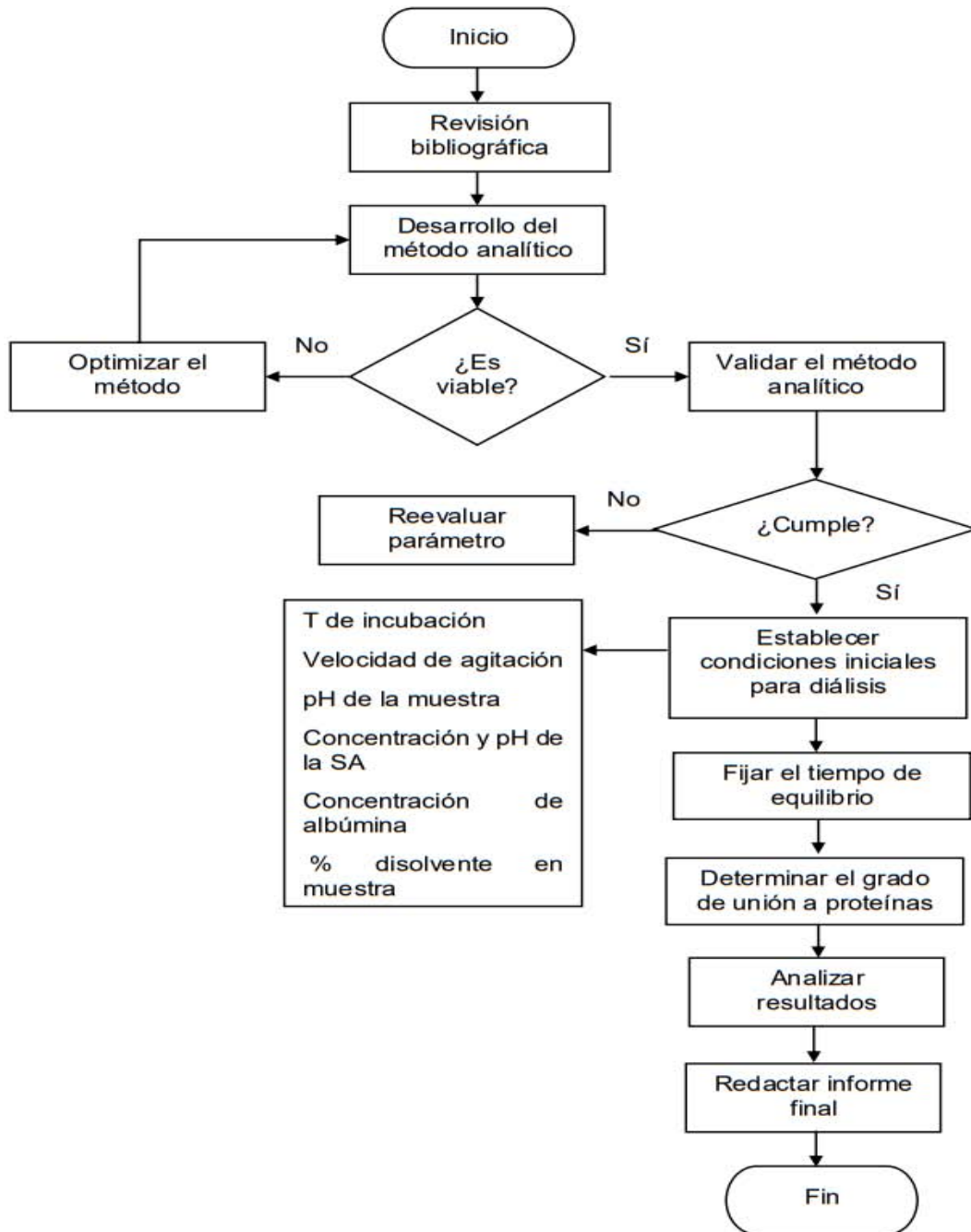
Reactivos	Marca	Lote
Agua desionizada, filtrada en el equipo Milli-Q	Theissier	-
Fosfato de potasio monobásico anhidro	JT Baker	3246-05
Fosfato de potasio dibásico	JT Baker	3252-05
Ácido fosfórico	-	-
Metanol grado HPLC	Tecsiquim	TEC-589-P5-H
Etanol absoluto	Tecsiquim	ET1550-7
Ácido acético glacial	JT Baker	9508-02
Sulfametoxazol	-	A-30211512018
Trimetoprima	-	J1603023
Dietilamina	-	-

Tabla 5. Material biológico.

Material biológico
Albúmina de huevo

7.1 Metodología

7.1.1 Diagrama de flujo



7.1.2 Desarrollo del método analítico por CLAR

En la etapa de desarrollo del método se evaluaron diferentes proporciones de fase móvil.

Se partió de una fase móvil Metanol-Solución amortiguadora (SA) de fosfatos pH3, 0.005 M, 50:50 (ver anexo I), con velocidad de flujo de 1 mL/min, volumen de inyección de 20 µL, una columna LC Phenomenex 5 µm, C₁₈, 150 x 4.6 mm, una longitud de onda de 254 nm, se analizó una solución de sulfametoxazol en fase móvil a 10 µg/mL y trimetoprima a 10 µg/mL en fase móvil como posible estándar interno.

Posteriormente, se analizaron los mismos fármacos a 50 µg/mL con una proporción de fase móvil 30:70 y un volumen de inyección de 100 µL y se realizó un barrido a una muestra de sulfametoxazol y trimetoprima a 20 µg/mL, utilizando un espectrofotómetro Varian, en donde se seleccionó la longitud de onda a la que se detectó la máxima señal para emplearla en los análisis posteriores.

7.1.3 Optimización del método analítico

En la etapa de optimización del método se empleó un modificador de la fase móvil para mejorar la simetría de los picos. Para ello, realizó el análisis de una solución de sulfametoxazol y trimetoprima a 20 µg/mL en fase móvil con una fase móvil: metanol-SA de fosfatos pH 3, 0.005 M, 30:70 + dietilamina 10⁻⁴ M. Velocidad de flujo: 1.5 mL/min, a 271 nm.

Por otro lado, para el análisis de sulfametoxazol en albúmina se evaluaron diferentes proporciones de solución desproteinizante (estándar interno trimetoprima a 10 µg/mL en ác. Acético-metanol al 1 %) 1:1 y 1:2 con respecto a la muestra.

Se adicionó a un tubo Eppendorf 250 μL de solución del estándar interno (SI) en ácido acético-metanol al 1%, 250 μL de SA de fosfatos pH 7.4, 0.064 M y 250 μL de la muestra de sulfametoxazol a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución de albúmina a 8 mg/mL (ver anexo I). Para probar la otra proporción de solución de ác. Acético-metanol, se adicionó a un tubo Eppendorf 200 μL de solución del estándar interno (SI) en ácido acético-metanol al 1%, 100 μL de la muestra de sulfametoxazol en solución de albúmina y 100 μL de SA de fosfatos pH 7.4, 0.064 M.

Ambos métodos se trataron como se indica: Se mezcló en el vórtex por 1 minuto, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un micro vial y se inyectaron las muestras con las siguientes condiciones: fase móvil metanol-SA de fosfatos pH 3, 0.005 M, 30:70 + dietilamina 10^{-4} M (ver anexo I). Volumen de inyección: 20 μL . Columna: LC Phenomenex 5 μm , C18, 150 x 4.6 mm. Velocidad de flujo: 1mL/min. Longitud de onda: 271 nm.

7.1.4 Método analítico

Condiciones cromatográficas:

Fase móvil: Metanol-SA de fosfatos pH 3, 0.005 M, 30:70 + dietilamina 10^{-4} M (ver anexo I). Volumen de inyección: 20 μL . Columna: LC Phenomenex 5 μm , C18, 150 x 4.6 mm. Longitud de onda: 271 nm. Velocidad de flujo: 1mL/min.

Preparación de la muestra: Preparar una solución de sulfametoxazol a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en una solución de albúmina en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 0.064 M a 8 mg/mL , a partir de una solución Stock de sulfametoxazol en metanol (ver anexo I).

Preparación del estándar interno: preparar una solución de trimetoprima a 10 µg/mL en una solución de ácido acético-metanol al 1% (ver anexo I).

Tratamiento: adicionar a un tubo Eppendorf 200 µL de solución del estándar interno (SI) en ácido acético-metanol al 1%, 100 µL de SA de fosfatos pH 7.4, 0.064 M y 100 µL de la muestra de sulfametoxazol en solución de albúmina, mezclar en el vórtex por 1 minuto, centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos, transferir el sobrenadante a un micro vial e inyectar bajo las condiciones establecidas.

Preparación del blanco: adicionar a un tubo Eppendorf 200 µL de solución ácido acético-metanol al 1%, 100 µL de SA de fosfatos pH 7.4, 0.064 M, 100 µL de solución de albúmina, aplicar el tratamiento establecido previamente.

Muestra cero: adicionar a un tubo Eppendorf 200 µL de solución del estándar interno en ácido acético-metanol al 1%, 100 µL de SA de fosfatos pH 7.4, 0.064 M, 100 µL de solución de albúmina, aplicar el tratamiento establecido previamente.

7.1.5 Validación del sistema

- **Linealidad del sistema**

Se prepararon por triplicado cinco niveles de concentración de sulfametoxazol en fase móvil a 1, 3, 5, 7 y 10 µg/mL a partir de una solución Stock a 800 µg/mL de sulfametoxazol en metanol. Se utilizó una solución del estándar interno (SI) trimetoprima a 10 µg/mL en fase móvil. (Ver anexo I).

Posteriormente, en viales por separado se adicionaron 500 µL de la solución de SI, 250 µL de cada solución de sulfametoxazol a la concentración correspondiente y 250 µL de

fase móvil, se mezcló en el vórtex por 1 minuto y se inyectaron las muestras preparadas en el mismo día, bajo las condiciones seleccionadas en la optimización del método.

Se incluyó un blanco (fase móvil) y una muestra cero (500 µL de fase móvil, y 500 µL de solución del SI en fase móvil).

Una vez obtenidos los cromatogramas de las muestras, se determinó la respuesta analítica para cada nivel de concentración dividiendo el área bajo la curva (ABC) del sulfametoxazol entre el ABC del estándar interno, se realizó la regresión lineal de los datos de respuesta en función de la concentración, se determinó el coeficiente de determinación (r^2), la ordenada al origen (b) y la pendiente (m), se realizó el análisis estadístico de la ordenada al origen y la pendiente con el estadígrafo t de Student, con un intervalo de confianza del 95% (ver anexo II). Se tomaron como criterios de aceptación: $r^2 \geq 0.98$, $m \neq 0$, $b = 0$.

- **Precisión del sistema**

A partir de una solución Stock de sulfametoxazol a 800 µg/mL en metanol grado HPLC, se prepararon por sextuplicado soluciones de sulfametoxazol a 5 µg/mL en fase móvil. Se utilizó una solución del estándar interno a 10 µg/mL en fase móvil. (Ver anexo I).

En viales por separado, se adicionaron 500 µL de la solución de SI, 250 µL de cada solución de sulfametoxazol y 250 µL de fase móvil, se mezcló en el vórtex por 1 minuto e inyectó las soluciones preparadas en el mismo día bajo las condiciones establecidas en la optimización del método analítico.

Con los datos obtenidos del área bajo la curva del analito y el estándar interno se determinó el promedio y la desviación estándar de las respuestas para determinar el

coeficiente de variación (ver anexo II). Se tomó como criterio de aceptación un valor de $CV \leq 3\%$.

7.1.6 Validación del método

- **Tratamiento de las muestras**

En un tubo Eppendorf se adicionaron 200 μL de solución del estándar interno (SI) en ácido acético-metanol al 1%, 100 μL de la muestra de sulfametoxazol en solución de albúmina, 100 μL de SA de fosfatos pH 7.4, 0.064 M, se mezcló en el vórtex por 1 minuto, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un micro vial y se inyectaron las muestras bajo las condiciones establecidas en la optimización del método.

Para la preparación del blanco se adicionó a un tubo Eppendorf 200 μL de solución ácido acético-metanol al 1%, 100 μL de SA de fosfatos pH 7.4, 0.064 M, 100 μL de solución de albúmina y se aplicó el tratamiento establecido previamente.

Muestra cero: se adicionó a un tubo Eppendorf 200 μL de solución del estándar interno en ácido acético-metanol al 1%, 100 μL de SA de fosfatos pH 7.4, 0.064 M, 1000 μL de solución de albúmina, se aplicó el tratamiento establecido previamente. Se aplicó este tratamiento para todas las muestras utilizadas en la validación del método analítico, excepto en la especificidad.

- **Especificidad**

Con el fin de evaluar las posibles interferencias con la matriz biológica, se prepararon las siguientes muestras, en diferentes tubos Eppendorf:

- 250 µL de solución de albúmina + 500 µL de solución de ácido acético-metanol al 1% + 250 µL de fase móvil (ver anexo I).
- 250 µL de solución de albúmina + 250 µL de SA de fosfatos pH 7.4 + 500 µL de solución de ácido acético-metanol al 1%.
- 250 µL de solución de albúmina + 500 µL de solución de estándar interno (SI) en ácido acético-metanol + 250 µL de SA de fosfatos pH 7.4.
- 250 µL de solución de albúmina + 250 µL de sulfametoxazol a 5 µg/mL en fase móvil + 500 µL de ácido acético-metanol al 1%.
- 250 µL de sulfametoxazol a 5 µg/mL en albúmina + 250 µL de SA de fosfatos pH 7.4 + 500 µL de solución del estándar interno en ácido acético metanol al 1%.

Posteriormente, se agitaron las muestras en el vórtex por 1 minuto, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a diferentes viales y se inyectaron bajo las condiciones establecidas en la optimización del método. Se verificó la ausencia de señales que pudieran interferir con la cuantificación del analito.

- **Límite de cuantificación**

Se prepararon por triplicado soluciones de sulfametoxazol a 0.5 µg/mL (5% de la concentración máxima esperada del fármaco, es decir; 10 µg/mL), 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.74 y 1 µg/mL en albúmina (ver anexo I), se aplicó el tratamiento mencionado previamente y se inyectaron en el cromatógrafo. Después, se determinó la respuesta con el área bajo la curva de sulfametoxazol y del estándar interno, el promedio y desviación estándar para calcular el coeficiente de variación (ver anexo II). En donde, se consideró como criterio de aceptación para el límite de cuantificación si su valor promedio se encontraba dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal de la concentración, con un

coeficiente de variación menor o igual que 20% y que presentaran por lo menos una relación señal ruido de 10:1.

- **Linealidad del método**

Para evaluar la linealidad del método se prepararon por triplicado cinco niveles de concentración de sulfametoxazol en solución de albúmina en un rango de 1-10 µg/mL. (Ver anexo I).

Posteriormente, se determinó la respuesta analítica para cada nivel de concentración dividiendo el área bajo la curva (ABC) de sulfametoxazol entre el ABC del estándar interno; se realizó la regresión lineal de los datos de respuesta en función de la concentración, se obtuvo el coeficiente de determinación (r^2), pendiente (m) y la ordenada al origen (b). En donde se utilizaron como criterios de aceptación un valor de $r^2 \geq 0.98$, $m \neq 0$ y $b = 0$; se realizó el análisis estadístico de la ordenada al origen y la pendiente con el estadígrafo t de Student con un intervalo de confianza del 95% (ver anexo II).

- **Precisión del método**

- **Repetibilidad**

En primer lugar, se prepararon por triplicado soluciones de sulfametoxazol en los niveles de concentración a 4, 5 y 6 µg/mL. (Ver anexo I).

A continuación, se determinó el coeficiente de variación de la respuesta analítica a cada nivel de concentración y de los porcentajes de recobro. En donde, se utilizó como criterio de aceptación un coeficiente de variación del valor promedio no mayor al 15%.

- **Precisión intermedia**

En cuanto a la precisión intermedia, se prepararon por triplicado muestras de sulfametoxazol a 5 µg/mL. (Ver anexo I) en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. (Ver anexo I).

Después, se calculó la respuesta analítica obtenida por cada analista en los diferentes días y el coeficiente de variación, el cual no debía ser mayor a 15% y, se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos por medio de análisis de varianza (ANADEVA) (ver anexo II).

- **Exactitud**

Para evaluar la exactitud, se prepararon por triplicado, soluciones de sulfametoxazol en albúmina a 1, 5 y 6 µg/mL (ver anexo I), luego, se determinó el porcentaje de recobro en cada nivel de concentración, en donde el valor promedio de las determinaciones debía encontrarse dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, la desviación estándar y el coeficiente de variación el cual, no debe ser mayor al 15%. Posteriormente, realizó el análisis estadístico por comparación de medias con el estadígrafo t de Student.

- **Estabilidad de la muestra**

- **Estabilidad a 37° C**

Primero, se analizaron por triplicado muestras de sulfametoxazol a 5 µg/mL (Ver anexo I) se colocaron las muestras en la incubadora a 37 °C, en donde se tomaron muestras a 1, 2, 3 y 4 horas, se realizó el tratamiento de las muestras para su posterior inyección.

Después, se calculó la cantidad recuperada con las respuestas obtenidas para cada intervalo de tiempo, la desviación estándar y el promedio de la concentración en cada intervalo de tiempo, el cual debía estar dentro del 15% de la concentración nominal. Finalmente, se determinó si se presentó una diferencia significativa en las señales obtenidas en los diferentes tiempos de prueba por medio del estadístico t de Student para diferencia de medias (ver anexo II).

- **Estabilidad en el automuestreador**

Para este parámetro, se realizó el tratamiento correspondiente a tres muestras de sulfametoxazol a 5 µg/mL (Ver anexo I), se colocaron en el automuestreador del cromatógrafo y se inyectaron en los intervalos de tiempo de 1, 2.5, 3, 4 y 5 horas.

Posteriormente, se calculó la cantidad recuperada con las respuestas obtenidas en cada para cada intervalo de tiempo, la desviación estándar y el promedio de la concentración en cada intervalo de tiempo, el cual debía estar dentro del 15% de la concentración nominal. Por último, se determinó si se presentó una diferencia significativa en las señales obtenidas en los diferentes tiempos de prueba por medio del estadístico t de Student para diferencia de medias (ver anexo II).

7.1.7 Estudio de unión a proteínas

- **Preparación de la placa base**

Primeramente, se enjuagaron los pocillos de la placa base con etanol al 20% (Ver anexo I) por 10 minutos posteriormente, se removió el etanol y se enjuagó dos veces con agua ultrapurificada, se permitió que la placa secase y se utilizó inmediatamente.

- **Tiempo de equilibrio**

Con el fin de fijar el tiempo de equilibrio para la etapa posterior, se prepararon muestras de sulfametoxazol a 5 µg/mL en albúmina por triplicado (ver anexo I). Se adicionaron a tres insertos diferentes colocados en la placa base, 500 µL de la muestra de sulfametoxazol en el compartimiento para la muestra, indicado por un anillo rojo, y 750 µL de solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M pH 7.4 (Ver anexo I) al compartimiento para solución amortiguadora de diálisis. Se cubrieron los insertos con cinta de sellado, se mantuvo con agitación continua en un agitador vórtex a 995 rpm, se incubó a 37 ° C.

En tubos Eppendorf por separado, se adicionaron 100 µL de muestra de cada compartimiento de los insertos, es decir, SA de diálisis y de muestra del fármaco a 30 minutos, 1, 1.5, 2, 3 y 4 h. Después de cada muestreo, con el fin de igualar matrices, se aplicó el tratamiento mencionado en la sección 7.1.4 y se inyectaron las muestras en las condiciones establecidas en la misma; en donde si se trataba de una alícuota de albúmina se le adicionó SA de fosfatos y los componentes necesarios para el tratamiento de la muestra y viceversa para la muestra de SA.

Para cada tiempo de muestreo se determinó la concentración de sulfametoxazol presente en cada muestra y se elaboró una gráfica del porcentaje de la concentración del fármaco libre (ver anexo II) a los diferentes tiempos empleados para seleccionar el tiempo necesario de incubación para alcanzar el equilibrio, el cual se empleó para incubar las muestras en la determinación del grado de unión del fármaco a albúmina.

- **Grado de unión a proteínas**

En esta etapa del estudio, se prepararon por triplicado muestras de sulfametoxazol a 5, 6 y 7 $\mu\text{g/mL}$ en solución de albúmina. Se adicionaron a tres insertos diferentes en la placa base, 500 μL de la muestra de sulfametoxazol en el compartimiento para la muestra, indicado por un anillo rojo, y 750 μL de solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M pH 7.4 (Ver anexo I) al compartimiento para solución amortiguadora de diálisis. Se cubrieron los insertos con cinta de sellado, se mantuvo con agitación continua en un agitador vórtex a 995 rpm y se incubó a 37 ° C por el tiempo determinado en la etapa de tiempo de equilibrio para el fármaco de prueba.

Posteriormente, en diferentes tubos Eppendorf se adicionaron 100 μL de muestra de cada compartimiento de los insertos, es decir, SA de diálisis y de muestra del fármaco en albúmina, para igualar matrices se aplicó el tratamiento establecido en la sección 7.1.4 y se inyectaron las muestras en las condiciones establecidas en la misma; en donde si se trataba de una alícuota de albúmina se le adicionó SA de fosfatos y los componentes necesarios para el tratamiento de la muestra y viceversa para la muestra de SA.

Con los datos obtenidos se determinó la concentración de sulfametoxazol presente en cada muestra y se determinó el porcentaje de fármaco unido a proteínas (ver anexo II).

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1 Desarrollo del método analítico

Para el desarrollo del método analítico se partió de una fase móvil conformada por metanol-SA de fosfatos, pH 3, 0.005 M, 50:50, con las siguientes condiciones cromatográficas: velocidad de flujo: 1 mL/min. Volumen de inyección: 20 μ L. Columna: LC Phenomenex 5 μ m, C₁₈, 150 x 4.6 mm. Fármacos: Sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP) como estándar interno a 10 μ g/mL. Longitud de onda: 254 nm.

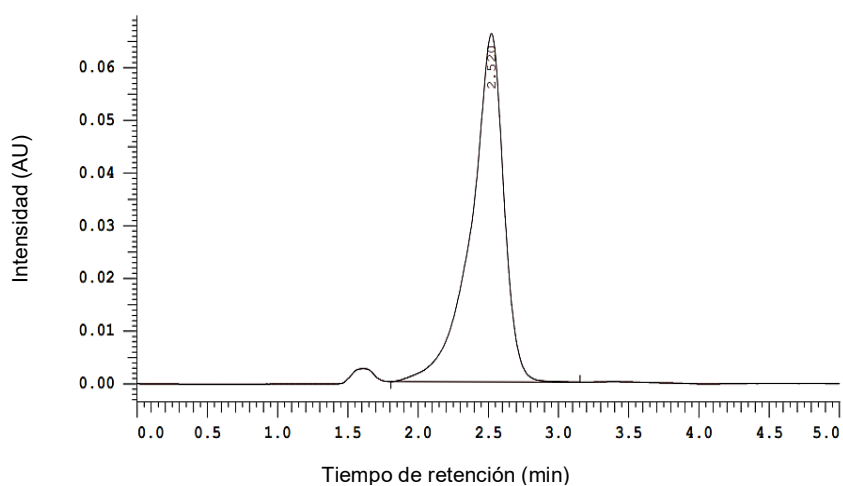


Figura 1. Cromatograma de sulfametoxazol a 10 μ g/mL, fase móvil Metanol-SA fosfatos 50:50.

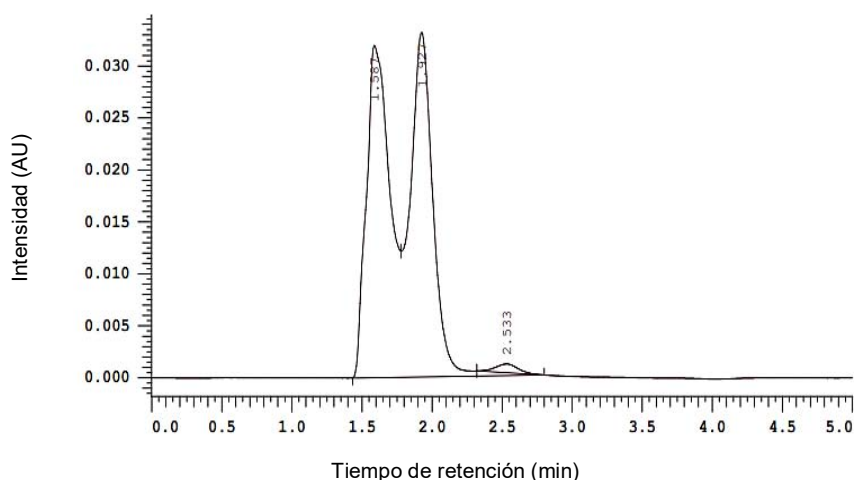


Figura 2. Cromatograma de trimetoprima a 10 μ g/mL, fase móvil Metanol-SA de fosfatos 50:50.

Como se observa en la figura 1, a pesar de que se obtuvo una señal para el sulfametoxazol a los 2.52 minutos, ésta se encuentra cerca del frente del eluyente ya que a pesar de que el fármaco no es completamente soluble en la fase móvil, no presenta gran afinidad por la fase estacionaria, lo que se traduce en un tiempo de retención bajo y cercano al frente del eluyente.³⁵⁻³⁶ Mientras que en la figura 2, se observa que, al emplear una fase móvil en una proporción 50:50 para la trimetoprima, se obtuvo una señal no definida, lo que quiere decir que ésta fase móvil no es adecuada para su análisis. Por lo que se decidió emplear una fase móvil con una mayor proporción de disolvente polar³⁵ (SA de fosfatos) para disminuir la solubilidad de los fármacos en la fase móvil, aumentar la afinidad de estos por la fase estacionaria y, por lo tanto, los tiempos de retención de los fármacos.

Posteriormente, se probó la fase móvil Metanol-SA de fosfatos, pH 3, 0.005 M, 30:70, con un volumen de inyección de 100 µL, longitud de onda: 254 nm, columna C₁₈.

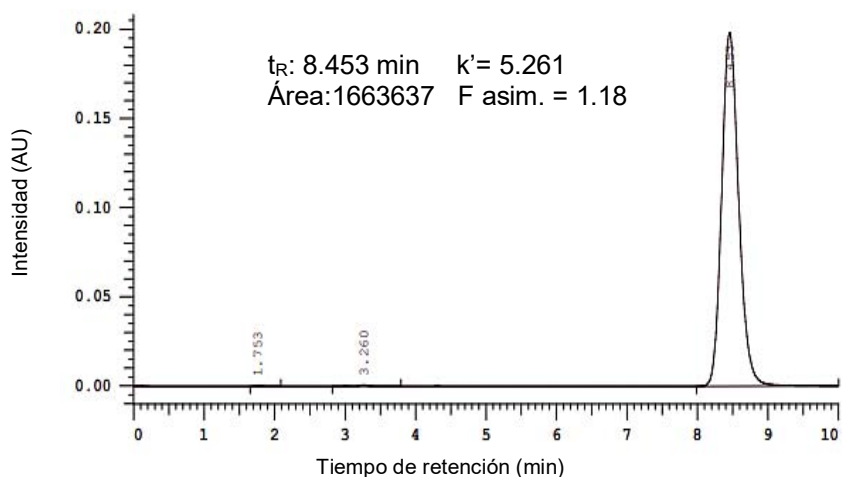


Figura 3. Cromatograma de sulfametoxazol a 50 µg/mL, fase móvil Metanol-SA fosfatos 30:70.

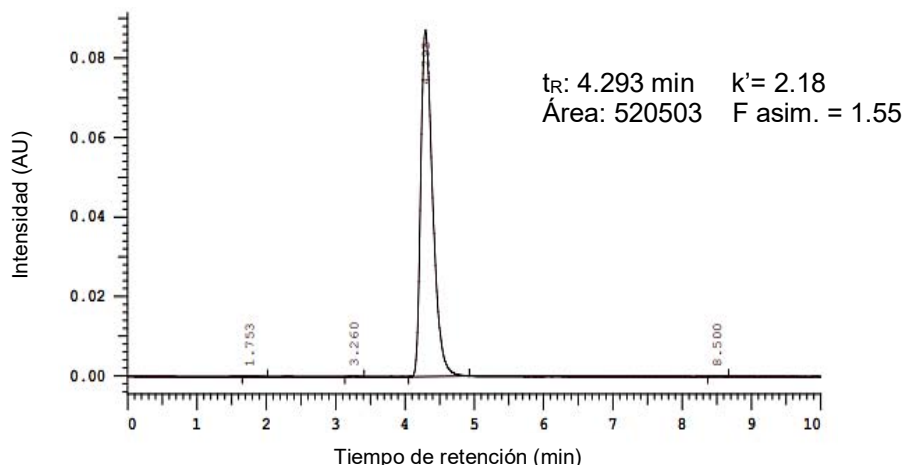


Figura 4. Cromatograma de trimetoprima a 50 $\mu\text{g/mL}$, fase móvil Metanol-SA fosfatos 30:70.

Como se observa en las figuras 3 y 4, al aumentar la proporción de agua en la fase móvil, el tiempo de retención para los fármacos empleados aumentó, debido a que disminuyó su afinidad por la fase móvil y, por lo tanto, se retienen más en la fase estacionaria. También se observó que los compuestos eluyeron en orden de polaridad de manera que, el más polar, en este caso la trimetoprima, eluyó primero y después el sulfametoxazol.³⁵ Sin embargo, para ambos casos se observan picos con asimetría positiva, lo cual puede deberse a interacciones no deseadas entre el soluto y la fase estacionaria debido a la presencia de grupos silanol en la superficie de esta.³⁵⁻³⁷

Posteriormente, a una muestra de sulfametoxazol y trimetoprima se les realizó un barrido, utilizando un espectrofotómetro Varian.

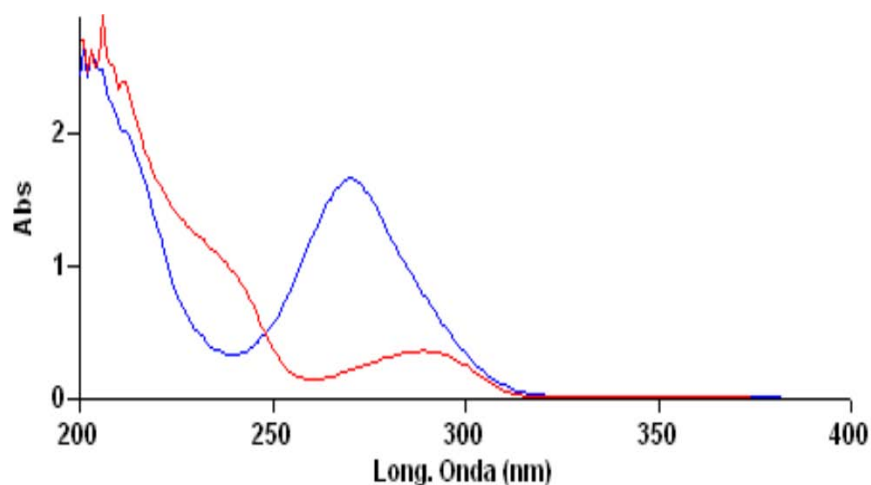


Figura 5. Barrido UV de sulfametoxazol (azul) y trimetoprima (rojo) a 20 µg/mL.

A partir del cual, se decidió utilizar para los análisis posteriores una longitud de onda de 271 nm, para obtener mayor sensibilidad en el análisis tanto para sulfametoxazol como para trimetoprima.

8.2 Optimización del método analítico

Con la finalidad de disminuir la asimetría de los picos, se probaron las siguientes condiciones: Fase móvil: SA de fosfatos-Metanol, pH 3, 0.005 M, 70:30 + Dietilamina 10^{-4} M. Velocidad de flujo: 1.5 mL/min. Volumen de inyección: 20 µL. Columna: LC Phenomenex 5 µm, C₁₈, 150 x 4.6 mm. Fármacos: Sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP) a 20 µg/mL

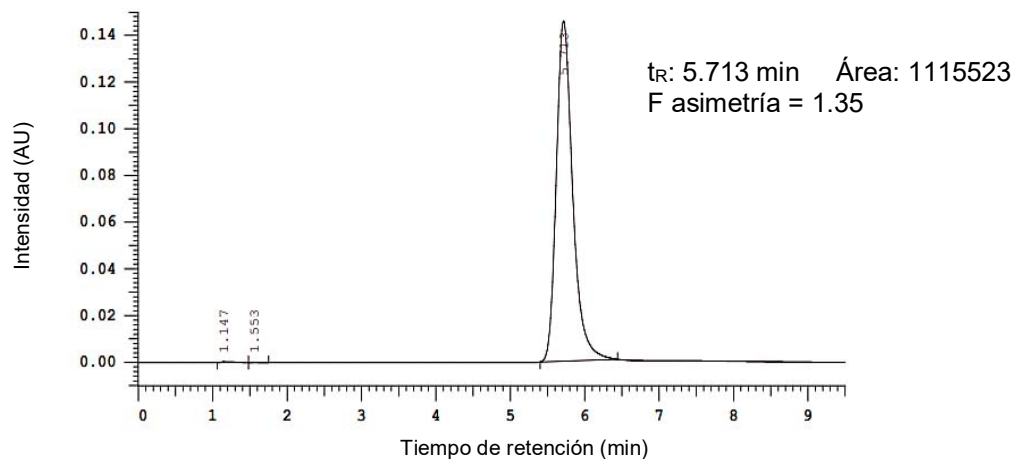


Figura 6. Cromatograma de Sulfametoxazol a 20 $\mu\text{g/mL}$, fase móvil Metanol-SA fosfatos 30:70, pH 3, + Dietilamina 10^{-4} M, λ 271 nm.

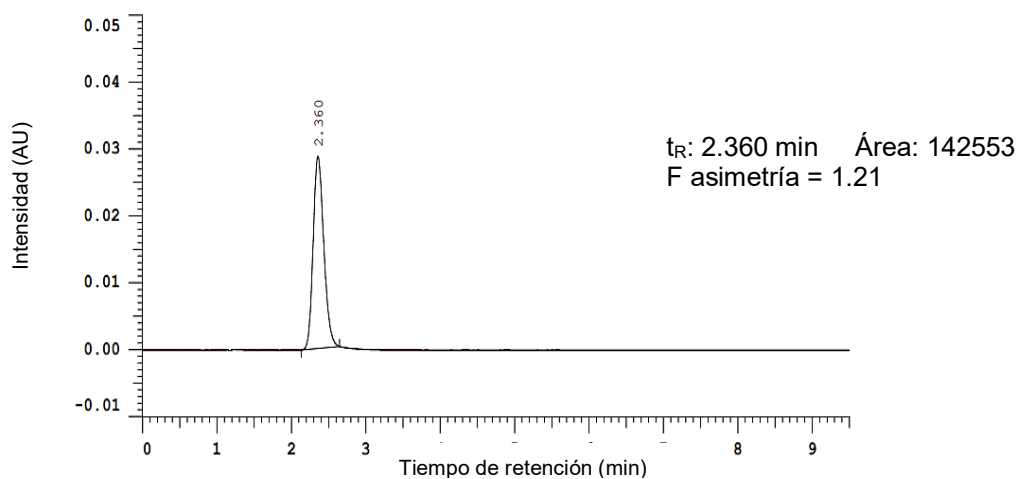


Figura 7. Cromatograma de trimetoprima a 20 $\mu\text{g/mL}$, fase móvil Metanol-SA fosfatos pH 3, 30:70 + Dietilamina 10^{-4} M, λ 289 nm.

Como se observa en las figuras 6 y 7, tanto el sulfametoxazol como la trimetoprima tienen un factor de asimetría aceptable, es decir, menor a dos.³⁸ Como se mencionó anteriormente, la asimetría positiva en los picos puede ser causado por interacciones no deseadas del analito con la fase estacionaria, lo cual puede ser reducido al adicionar una amina como la dietilamina a la fase móvil ya que la amina enmascara los grupos silanol en la fase estacionaria, evitando procesos de intercambio iónico.³⁷

Para el análisis de sulfametoxazol en albúmina se evaluaron diferentes proporciones de solución desproteinizante ácido acético-metanol al 1 %. Las muestras de sulfametoxazol se prepararon a 5 µg/mL en una solución de albúmina a 8 mg/mL en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

Al utilizar una relación 1:1 de las soluciones empleadas para el tratamiento de la muestra en albúmina se observó, después de 60 minutos la formación de un precipitado en los viales, por lo que se aumentó la proporción de ácido acético-metanol; es decir, una relación 1:2 con respecto al analito en albúmina.

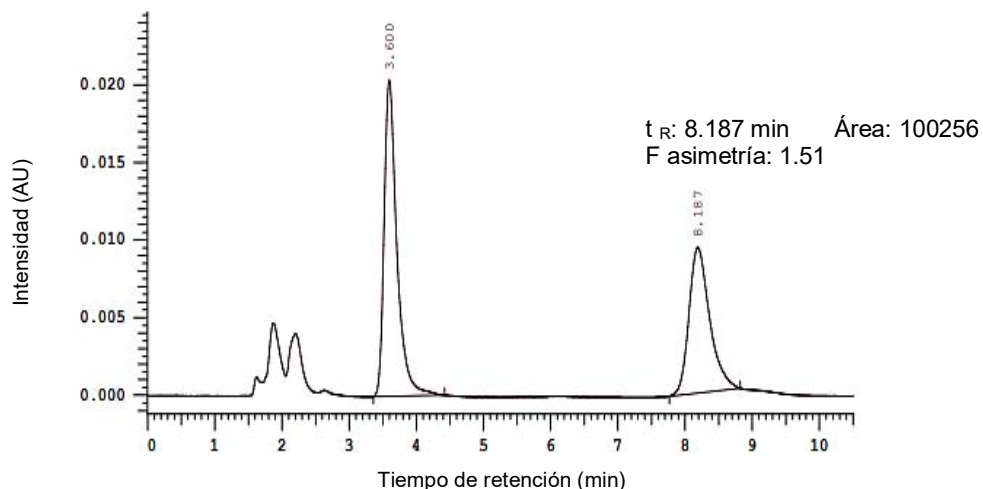


Figura 8. Cromatograma de sulfametoxazol (5 µg/mL) $t_R= 8.187 \text{ min}$ + SI (trimetoprima 10 µg/mL) $t_R=3.6 \text{ min}$, fase móvil Metanol-SA fosfatos 30:70 + dietilamina 10^{-4} M pH 3, 0.005 M, λ 271 nm.

Como se observa en la figura 8, el primer fármaco en eluir fue la trimetoprima ya que es más afín por la fase móvil en comparación con el sulfametoxazol, que al ser un compuesto menos polar presenta mayor afinidad por la fase estacionaria se retiene más en esta,³⁵ el factor de asimetría obtenido para sulfametoxazol fue de 1.5 el cual es aceptable ya que es menor a 2,³⁸ otro parámetro importante en la cromatografía de líquidos es la resolución, la cual indica el grado de separación entre dos picos adyacentes³⁵ que, en este caso fue de 10.65.

8.3 Validación del sistema

8.3.1 Linealidad del sistema

Con el fin de verificar si la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustaban a un modelo lineal en el intervalo de concentraciones de trabajo³⁹, se determinó la respuesta analítica, se realizó la regresión lineal de los datos de respuesta en función de la concentración, se determinaron los coeficientes de regresión la ordenada al origen (b), la pendiente (m), el coeficiente de determinación (r^2), obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Coeficientes de regresión y determinación obtenidos $n=15$.

Especificación	Resultado
$m \neq 0$	$m=0.1332$
$b=0$	$b=0.0006$
$r^2 \geq 0.98$	$r^2=0.9989$

Posteriormente, para definir la calidad de ajuste al modelo se realizó el análisis estadístico con la prueba t de Student con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Para la comprobación de los coeficientes de regresión se plantearon las siguientes hipótesis:

$H_0: m=0$

$H_0: b=0$

$H_A: m \neq 0$

$H_A: b \neq 0$

Tabla 7. Resultados de prueba t de Student para los coeficientes de regresión

Parámetro	m	b
$t_{\text{tablas}} (t_{0.975, 13})$	± 2.1604	± 2.1604
t_{calc}	109.7544	0.7817
Criterio		
Decisión	Si $t_{\text{calc}} < t_{\text{tablas}}$, se acepta H_0	
	$m \neq 0$	$b=0$

Posteriormente, se determinó el intervalo de confianza para los coeficientes de regresión, con un 95 % de confianza.

$$IC_m = 0.135921 < m < 0.1306741$$

$$IC_b = -0.015341 < b < 0.0164928$$

Como se observa en la tabla 7, el valor obtenido de t calculada para la pendiente rebasa el intervalo de no rechazo, por lo que se rechaza la hipótesis nula y la pendiente es diferente de cero, con un 95% de confianza, es decir, la respuesta aumentará a medida que aumente la concentración del analito. Mientras que valor de t calculada obtenido para la ordenada al origen se encuentra dentro de la zona de no rechazo por lo que se acepta la hipótesis nula y la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero con un 95% de confianza, es decir, cuando no existe analito en la muestra, no se observará señal analítica alguna.⁴⁰⁻⁴¹

Por otro lado, el coeficiente de determinación mide la proximidad del ajuste de la ecuación de regresión de la muestra de los valores observados de “ y ”, como se observa en la tabla 6, el valor obtenido para el coeficiente de determinación fue de 0.9989 lo que quiere decir que, al menos, el 99% de la variación total en los valores de “ y ” es explicada por la regresión.⁴¹ Posteriormente, se realizó el análisis estadístico mediante el análisis de varianza la regresión (ver anexo II), para comprobar si existía una relación lineal entre los datos obtenidos con respecto a la concentración; teniendo como hipótesis:

H_0 : Existe una relación lineal significativa entre la concentración y la respuesta analítica ($F_{\text{calc}} \geq F_{\text{tablas}}$).

H_A : No existe una relación lineal significativa entre la concentración del analito y la respuesta analítica ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tablas}}$).

Tabla 8. Resultados de ANADEVa para linealidad del sistema.

Prueba con estadígrafo F de Fisher para linealidad del sistema

F_{tablas}	4.67
F_{calc}	12046.029
Criterio	Si $F_{\text{calc}} > F_{\text{tablas}}$, se acepta H_0
Decisión	Existe correlación lineal

Como se observa en la tabla 8, el valor obtenido de F calculado es mayor que el valor de F de tablas, lo que se traduce en que los datos de concentración del analito y la respuesta se ajustan a un modelo lineal, por lo tanto, hay linealidad en el sistema.

Con los datos obtenidos, se construyó un gráfico con las respuestas obtenidas en cada nivel de concentración en las diferentes repeticiones (figura 9).

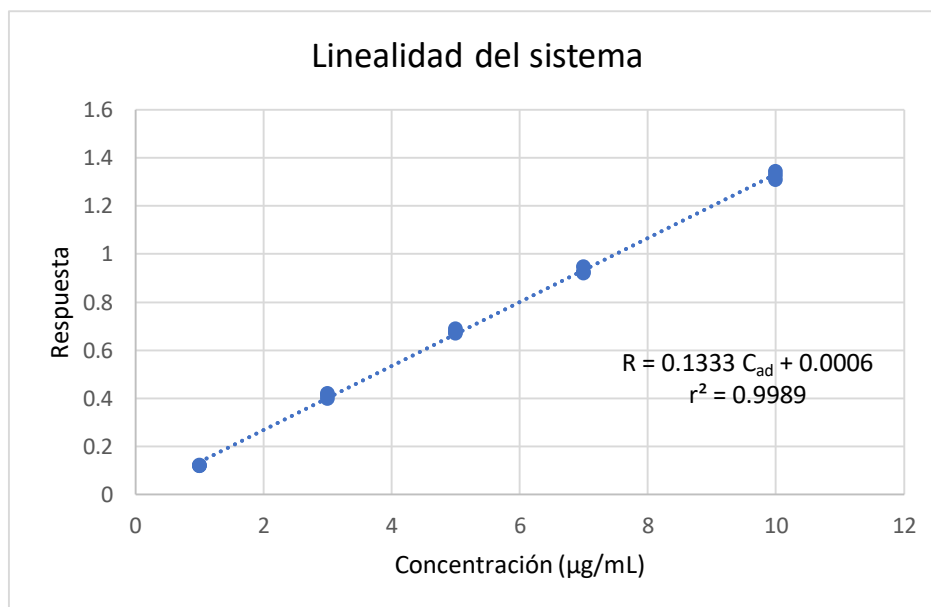


Figura 9. Linealidad del sistema.

8.3.2 Precisión del sistema

Se determinó el promedio y la desviación estándar de las respuestas para determinar el coeficiente de variación, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la precisión del sistema n=6.

Especificación	Resultado
CV ≤ 3%	CV= 1.8816

Con esta prueba se busca verificar la variación inherente a la respuesta analítica por el uso de equipos, instrumentos de medición, el procedimiento de análisis, el mismo analista entre otros factores, de modo que no sobrepase un valor preestablecido, en este caso que el coeficiente de variación de las repuestas no sea mayor al 3%, como se observa en la tabla 9, el coeficiente de variación de las respuestas obtenido es menor al 3%, de tal forma que se puede decir que el sistema no contribuye por sí mismo de manera significativa las variaciones aleatorias en los resultados del análisis es decir, que hay concordancia entre las respuestas obtenidas de las muestras preparadas, bajo las condiciones de análisis establecidas. ^{40,42}

8.4 Validación del método analítico

8.4.1 Especificidad

En esta prueba se evaluó la capacidad del método analítico para diferenciar y cuantificar el analito de manera inequívoca en presencia de otros componentes en la muestra, los cuales potencialmente pudieran interferir con su análisis.^{40,43} Para ello, se prepararon diferentes muestras conteniendo los productos que pudieran interferir con el analito durante su análisis, en este caso se evaluaron las soluciones que se utilizarían para el tratamiento de las muestras.

Como se observa en la figura 10, no se observa interferencia alguna con el analito (sulfametoxazol) y las soluciones empleadas para el tratamiento de las muestras en

albúmina, por lo tanto, el método es específico, es decir, la respuesta obtenida durante el análisis es debida únicamente al analito de interés.⁴⁰

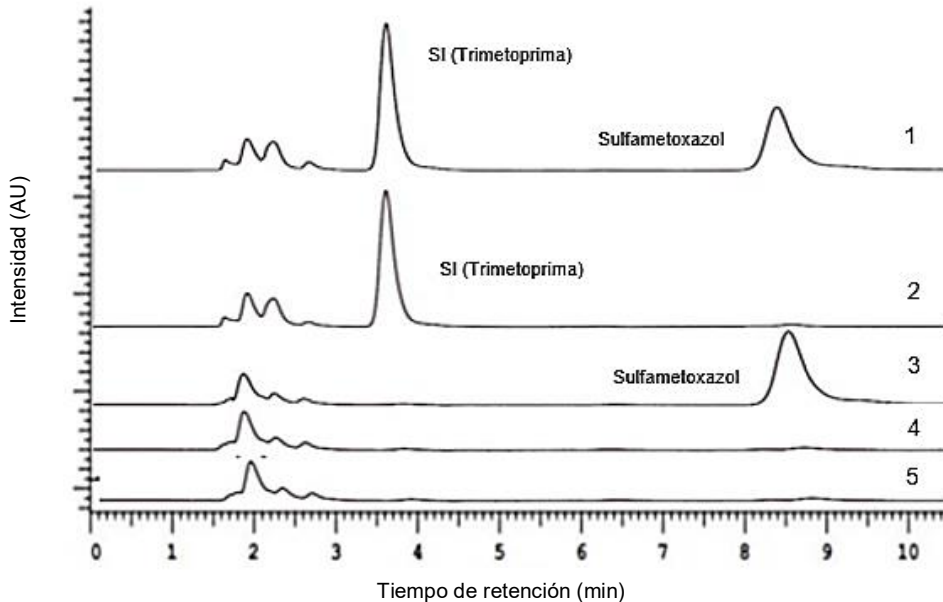


Figura 10. Especificidad del método. Cromatograma 1 (sulfametoxazol en albúmina+SI en ác. Acético metanol+ SA pH 7.4), 2 (Albúmina+ SI en ác. Acético-metanol+ SA pH 7.4), 3 (Albúmina+ Sulfametoxazol en fase móvil+ ác. Acético-metanol), 4 (Albúmina+SA pH 7.4+ ác. Acético-metanol), 5 (Albúmina+ ác. Acético-metanol+ fase móvil).

8.4.2. Límite de cuantificación

Con el fin de establecer el mínimo valor de concentración en el que una medición aplicando el método establecido será confiable, cuantitativamente,⁴⁴ y tomando en cuenta que el método se empleará en un estudio de unión a proteínas, al determinar la concentración de analito en diferentes tiempos del fenómeno de diálisis se obtendrían concentraciones de éste relativamente bajas en alguno de los compartimientos de los insertos utilizados para diálisis al equilibrio, se decidió probar diferentes

concentraciones ya que la variabilidad que puede esperarse de un método analítico aplicado a la cuantificación de un compuesto en concentraciones bajas es alta.⁴⁰

Tabla 10. Concentraciones evaluadas y resultados obtenidos para establecer el límite de cuantificación. n=21

Concentración (µg/mL)	% Recobro	CV % Recobro	Relación señal ruido
1	102.8102	3.5380	13.27
0.74	82.4051	6.0891	9.21
0.5	123.3803	6.3421	3.97
0.25	120.7688	10.9728	4.44
0.15	103.0069	19.8940	3.47
0.1	94.0363	56.3856	3.21
0.05	-	-	2.10

Como se observa en la tabla 10, los porcentajes de recobro obtenidos para los diferentes niveles de concentración, tanto los niveles de 1 y 0.74 µg/mL cumplen con el criterio de encontrarse dentro del $\pm 20\%$ de la concentración nominal y de tener un coeficiente de variación menor al 20%⁴⁵, sin embargo, el nivel de 0.74 µg/mL no cumple con el criterio de presentar por lo menos una relación señal ruido 10:1,⁴⁴ por lo que se decidió establecer como límite de cuantificación el nivel de concentración de 1 µg/mL; mientras que en los otros niveles de concentración se obtuvo una relación señal ruido menor a 10 pero mayor a 3,⁴⁴ excepto para el nivel de 0.05 µg/mL para el que se obtuvieron señales no cuantificables y una relación señal ruido de 2:1 por lo que, se estableció el nivel de concentración de 0.1 µg/mL como límite de detección.

8.4.3. Linealidad del método

Se evaluó la linealidad del método en el intervalo de concentraciones de 1 a 10 µg/mL, se calcularon las respuestas. Para demostrar esta relación, se realizó el análisis de los datos de concentración del analito vs respuesta por el método de mínimos cuadrados,

se obtuvieron los coeficientes de regresión y el coeficiente de determinación que se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Coeficientes de regresión y determinación obtenidos $n=15$.

Especificación	Resultado
$m \neq 0$	$m = 0.1309$
$b = 0$	$b = 0.0363$
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9883$

Se realizó el análisis estadístico de los coeficientes de regresión con el estadígrafo t de Student con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, con las siguientes hipótesis:

$$H_0: m=0$$

$$H_0: b=0$$

$$H_A: m \neq 0$$

$$H_A: b \neq 0$$

Tabla 12. Análisis estadístico de los coeficientes de regresión.

Parámetro	m	b
$t_{\text{tablas}} (t_{0.975, 13})$	-2.1604 a 2.1604	
t_{calc}	33.1941	1.5177
Criterio	Si $t_{\text{calc}} < t_{\text{tablas}}$, se acepta H_0	
Decisión	$m \neq 0$	$b = 0$

Se determinó el intervalo de confianza para los coeficientes de regresión, con un 95% de confianza.

$$IC_m = 0.135921 < m < 0.1306741$$

$$IC_b = -0.015341 < b < 0.0164928$$

Como se observa en la tabla 12, en el caso de la pendiente, el valor de t calculado es mayor al intervalo de no rechazo, por lo que se rechaza la hipótesis nula y la pendiente es diferente de cero con 95% de confianza. Mientras que, para evaluar la ordenada al origen, el valor obtenido de t calculado se encuentra dentro del intervalo de no rechazo,

por lo que se acepta la hipótesis nula y la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero con un 95% de confianza, es decir, las mediciones son carentes de sesgo; por lo que el error aleatorio es despreciable y cuando no exista analito en la muestra, no se presenta señal analítica alguna.³⁹⁻⁴⁰

Posteriormente, para demostrar la existencia de una relación lineal significativa entre los datos obtenidos con respecto a la concentración la concentración del analito y la respuesta, se realizó el análisis estadístico mediante el análisis de varianza (ver anexo II) y se calcularon los valores de F de Fisher; teniendo como hipótesis:

H₀: Existe una relación lineal significativa entre la concentración y la respuesta analítica ($F_{\text{calc}} \geq F_{\text{tablas}}$).

H_A: No existe una relación lineal significativa entre la concentración del analito y la respuesta analítica ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tablas}}$).

Tabla 13. Resultados de ANADEVa para linealidad del método.

Prueba con estadígrafo F de Fisher para linealidad del método	
F _{tablas}	4.67
F _{calc}	1101.850
Criterio	Si $F_{\text{calc}} > F_{\text{tablas}}$, se acepta H ₀
Decisión	Existe correlación lineal

Como se observa en la tabla 13, el valor obtenido de F calculado es mayor que el valor de F de tablas, por lo que los datos de concentración del analito y la respuesta se ajustan a un modelo lineal, por lo tanto, hay linealidad en el método.

Se construyó un gráfico con las respuestas obtenidas en cada nivel de concentración en las diferentes repeticiones (figura 12).

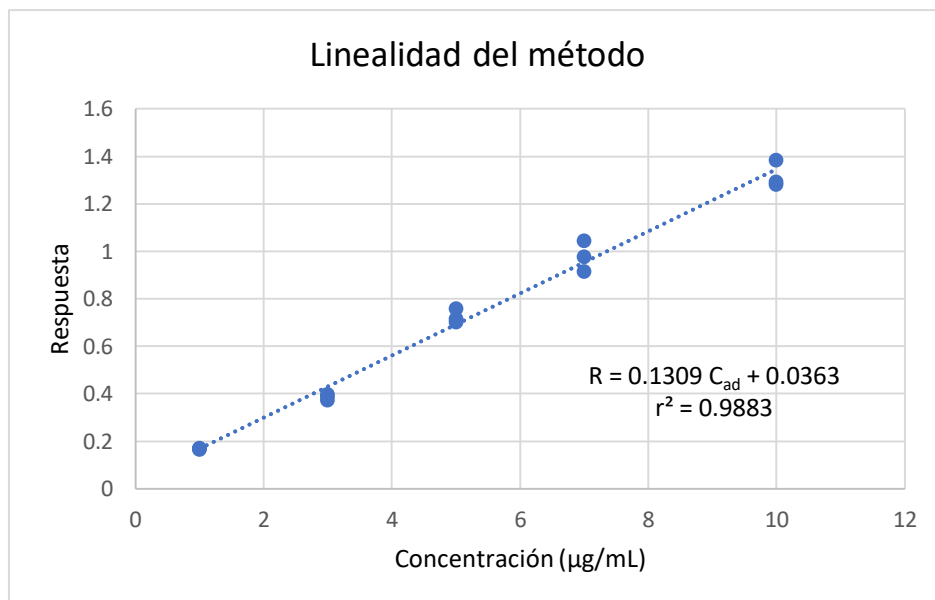


Figura 12. Linealidad del método.

Con los datos anteriores y en la figura 12, se puede observar que existe una relación lineal entre las variables estudiadas aun cuando se realiza el análisis del fármaco en albúmina.

8.4.4. Precisión del método

- **Repetibilidad**

Para observar en grado de dispersión de los resultados obtenidos ⁴⁰ se calculó el promedio y desviación estándar de la respuesta analítica y porcentajes de recobro obtenidos para cada nivel de concentración para calcular el coeficiente de variación. Se utilizó como criterio de aceptación un coeficiente de variación del valor promedio no mayor al 15%.

Tabla 14. Resultados obtenidos para repetibilidad del método n=9.

Concentración (µg/mL)	CV Respuesta analítica	cv % Recobro para los tres niveles
4	1.315	
5	0.338	2.799
6	3.413	

Como se observa en la tabla 14, el resultado del coeficiente de variación tanto para la respuesta analítica como para el porcentaje de recobro son menores al 15%, por lo que el método es repetible, es decir, no existe evidencia de que los resultados analíticos varíen significativamente al emplear las mismas condiciones de operación del método (laboratorio, analista, día y equipo), en un intervalo corto de tiempo.⁴⁰

- **Precisión intermedia**

Para demostrar la forma en que la variación de factores inherentes al laboratorio, en este caso analistas y días afectan los resultados del análisis en el trabajo cotidiano,^{40,44} en dos días diferentes, fueron evaluadas por triplicado muestras de sulfametoxazol equivalentes al 100 % de concentración, por dos analistas diferentes, se determinaron las respuestas analíticas.

Es importante no sólo concluir con los valores del coeficiente de variación sin un análisis estadístico adicional, ya que podría no tenerse en cuenta la posibilidad de que los resultados, aun cumpliendo con el criterio del coeficiente de variación menor a la especificación, no fueran comparables entre sí,⁴⁰ por lo que se realizó el análisis estadístico mediante un análisis de varianza (ANADEVA) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ (ver anexo II); en donde se debía cumplir para cada factor de variación (analista, día e interacción) que el valor de F calculada debía encontrarse dentro del intervalo de F de tablas.

Tabla 15. Resultados de ANADEVa para precisión intermedia.

Fuente de variación	F_{calc}	F_{tablas}	Decisión
Analista	0.918	0.1321 a 7.57	Existe precisión
Día	0.277		Existe precisión
Analista-día	3.940		Existe precisión

Como se observa en la tabla 15, el valor de F calculado tanto para el analista como para el día se encuentran comprendidos en el intervalo de F de tablas con una confianza del 95 % sin embargo, al comparar estos dos valores, es evidente que el valor obtenido para el factor analista es mayor por lo que se puede decir que es el que más contribuye a la variación; por otro lado, el valor de F calculado para la interacción analista-día se encuentra comprendido en la región de no rechazo, lo que se traduce en que el modelo con el que fueron analizados los datos fue el correcto⁴⁰ con lo anterior, se puede concluir que existe precisión intermedia en el método, es decir, no se presentan diferencias significativas en los resultados debidas al factor analista o día, siempre y cuando, se trabaje bajo las mismas condiciones de análisis.

8.4.5. Exactitud

Una vez obtenidos los resultados, se calculó el porcentaje de recobro para cada nivel de concentración, así como su coeficiente de variación el cual debía ser menor o igual al 15 % excepto para el límite de cuantificación que en este caso podía ser menor o igual al 20%.

Tabla 16. Coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración n=9.

Concentración (µg/mL)	cv % Recobro
1	3.717
5	0.356
6	3.563

Como se observa en la tabla 16, los valores del coeficiente de variación obtenido para los niveles de concentración cumplen con la especificación de ser menor al 15%. Posteriormente se determinó el valor promedio de los porcentajes de recobro obtenidos, el cual fue de 100.316 %, se realizó el análisis estadístico del mismo mediante el estadígrafo t de Student con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, se plantearon las siguientes hipótesis: $H_0: \mu=100$; $H_A: \mu \neq 100$

Tabla 17. Análisis estadístico del promedio de los porcentajes de recobro.

Parámetro	μ
$t_{\text{tablas}} (t_{0.975, 8})$	-2.3060 a 2.3060
t_{calc}	0.3755
Criterio	Si $t_{\text{calc}} < t_{\text{tablas}}$, se acepta H_0
Decisión	$\mu=100$

Como se observa en la tabla 17, el valor obtenido de F calculado, se encuentra en el intervalo de no rechazo, con un 95% de confianza, por lo que el método es exacto, es decir, las mediciones no se alejan en forma considerable del valor real contenido en las muestras.^{40,44}

8.4.6. Estabilidad de la muestra

- **Estabilidad a 37 °C**

Se analizaron por triplicado muestras de sulfametoxazol a 5 $\mu\text{g/mL}$ que se colocaron en la incubadora a 37° C, las cuales se analizaron a 1, 2, 3 y 4 horas después de aplicar el tratamiento correspondiente posteriormente, se calculó la cantidad recuperada para cada intervalo de tiempo, la desviación estándar y el promedio de la concentración en cada intervalo de tiempo el cual, debía estar dentro del 15% de la concentración nominal⁴⁵.

Tabla 18. Porcentaje de recobro obtenido para cada intervalo de tiempo N=3.

Tiempo (h)	%Recobro
1	99.049
2	101.766
3	97.333
4	103.587

Como se observa en la tabla 18, el porcentaje de recobro obtenido para todos los niveles de concentración no sobrepasa el criterio de $\pm 15\%$ de la concentración nominal.

Posteriormente, se determinó si se presentó una diferencia significativa en las señales obtenidas en los diferentes tiempos de prueba por medio del estadígrafo t de Student para el promedio de las diferencias del área bajo la curva al inicio y al final del periodo de incubación, en donde si la muestra es estable, se supone que el promedio de las diferencias es igual a cero,⁴⁰ se plantearon las siguientes hipótesis: Ho: $\mu_d=0$; HA: $\mu_d\neq 0$

Tabla 19. Análisis estadístico con t de Student para estabilidad a 37 °C.

Tiempo (h)	t _{calc}	t _{tablas}	Decisión
1	0.094		Estable
2	-0.081	-4.303 a	Estable
3	-0.680	4.303	Estable
4	-0.633		Estable

Como se observa en la tabla 19, el valor obtenido de t calculado para los tiempos evaluados se encuentra comprendido en el intervalo de no rechazo por lo que se concluyó que la muestra era estable a 37° C por 4 horas, con un 95% de confianza.

- **Estabilidad en el automuestreador**

Se realizó el tratamiento correspondiente a tres muestras de sulfametoxazol a 5 $\mu\text{g/mL}$, se colocaron en el automuestreador del cromatógrafo y se inyectaron en los intervalos

de tiempo de 1, 2.5, 3, 4 y 5 horas posteriormente, se calculó la cantidad recuperada para cada intervalo de tiempo y el promedio de la concentración en cada intervalo de tiempo el cual, debía estar dentro del 15% de la concentración nominal⁴⁵.

Tabla 20. Porcentaje de recobro obtenido para cada intervalo de tiempo N=3.

Tiempo (h)	%Recobro
1	95.120
2.5	96.657
3	95.106
4	95.555
5	91.100

Como se observa en la tabla 20, el porcentaje de recobro obtenido en todos los tiempos de prueba cumple con la especificación al ser menor al $\pm 15\%$ de la concentración nominal.

Posteriormente se determinó si se presentó una diferencia significativa en las señales obtenidas en los diferentes tiempos de prueba por medio del estadístico t de Student para el promedio de las diferencias entre el área bajo la curva al inicio y al final de cada intervalo de tiempo,⁴⁰ se plantearon las siguientes hipótesis: $H_0: \mu_d=0$; $H_A: \mu_d \neq 0$

Como se observa en la tabla 21, el valor obtenido de t calculado para todos los tiempos de prueba se encuentra comprendido en la región de no rechazo, por lo que, se concluyó que la muestra es estable bajo las condiciones del automuestreador por 5 horas, con un 95% de confianza.

Tabla 21. Análisis estadístico con *t* de Student para estabilidad en el automuestreador.

Tiempo (h)	<i>t</i> _{calc}	<i>t</i> _{tablas}	Decisión
1	0.760		Estable
2.5	0.032	-4.303	Estable
3	0.947	4.303	Estable
4	0.162		Estable
5	4.145		Estable

8.4.7 Estudio de unión a proteínas

- **Tiempo de equilibrio**

En la primera parte del estudio de unión a proteínas, se determinó el tiempo necesario para que el analito alcanzara el equilibrio, es decir en que la concentración de fármaco libre fuera igual en ambos lados de la membrana³. Tomando en cuenta que las medidas precisas y exactas dependen de establecer y mantener las condiciones de equilibrio durante el estudio, se establecieron condiciones críticas en el estudio de unión a proteínas tales como la concentración de la solución amortiguadora de diálisis, la concentración de albúmina a emplear y la velocidad de agitación, el pH, las concentraciones de las muestras y la temperatura.^{22, 23}

Con el fin de simular las condiciones fisiológicas, se realizó el estudio a 37 ° C, se empleó una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 a una concentración 0.064 M ya que, si la concentración de la solución amortiguadora es muy alta, existe la posibilidad de que se presente el volumen de Shift o de desplazamiento en el cual, la presión osmótica coloidal fuerza el flujo desde el compartimiento de la SA al lado de las proteínas del dispositivo, lo cual diluiría la concentración de proteínas, alteraría el equilibrio de unión y por lo tanto, una sobreestimación del fármaco libre; mientras que,

si se emplea una concentración baja se puede presentar el efecto de Donnan es decir una distribución desigual del fármaco libre en ambos lados de la membrana.^{22, 46-48} Estos fenómenos pueden ser despreciables al usar una solución amortiguadora adecuada bajo las condiciones típicas de ensayo y no es necesaria su medida rutinaria para el formato de 96 pocillos.^{12, 14, 49}

Se decidió emplear una velocidad de agitación de 995 rpm la cual permitiría maximizar el gradiente de concentración alrededor de la membrana de diálisis y utilizar los insertos sellados para evitar una posible pérdida por evaporación durante la incubación. Tanto en la etapa de validación del método analítico y en el estudio de unión a proteínas se utilizaron muestras con porcentaje final de disolvente proveniente de la solución stock menor a 1.25% del volumen total para no afectar la interacción de unión a proteínas ya que se han reportado casos, por ejemplo, con acetonitrilo en donde se observó una disminución en la unión a proteínas, debido a la competencia de este por los sitios de unión de la albúmina.^{22, 30} Debido a que en ocasiones la medida de la unión a proteínas plasmáticas representa técnicamente un reto, y a la importancia de este parámetro, muchas compañías farmacéuticas han implementado variaciones de la técnica de diálisis al equilibrio^{12, 23, 49} tales como el método de dilución en el cual, se utiliza plasma diluido para incrementar la concentración de fármaco libre, facilitando su cuantificación y acortar el tiempo necesario para saturar la unión no específica, el método de dilución ha sido empleado para analizar compuestos que debido a sus propiedades fisicoquímicas pueden representar un reto como el caso de fármacos con un porcentaje de unión muy alto, muy lipofílicos o con elevado peso molecular, se ha reportado que empleando plasma diluido 5, 10 y hasta 20 veces ha proporcionado resultados

confiables para este tipo de compuestos.^{12,23} Tomando en cuenta lo anterior, se emplearon muestras del analito preparadas en solución de albúmina a 8 mg/mL.

Posteriormente, con los datos obtenidos se elaboró una gráfica del porcentaje del fármaco libre con respecto al tiempo (ver anexo II).

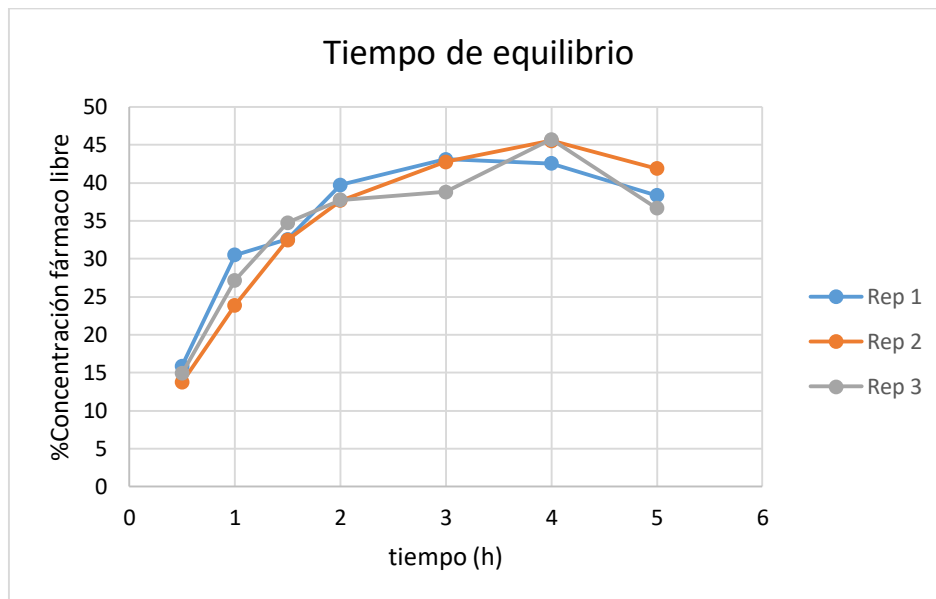


Figura 13. Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio para sulfametoxazol a 5 µg/mL, por triplicado.

Como se observa en la figura 13, el tiempo necesario para que el analito alcanzara el equilibrio fue de 2 horas. Ya que a partir de este tiempo se observa un comportamiento de los datos en el que hasta cierto punto el porcentaje de fármaco unido comienza a disminuir, lo cual se puede deber a que los sitios de unión de la albúmina se empiezan a saturar, con el consecuente incremento de la concentración del fármaco libre. Como se observa, el tiempo requerido es menor al tiempo típico de incubación, debido a que, al emplear albúmina diluida, el valor aparente de la fracción no unida es alta y la concentración de fármaco aumenta, además de que el sulfametoxazol es un fármaco altamente permeable y al entrar en contacto con la membrana de diálisis que, para el

caso de los insertos empleados es grande, se logra alcanzar el estado de equilibrio en un menor tiempo.^{3, 4, 12}

- **Grado de unión a proteínas**

Tomando en cuenta que en los estudios del grado de unión a proteínas se suele usar por lo menos 3 concentraciones de prueba del analito, que se encuentren dentro del rango terapéutico y toxicológico del mismo, normalmente de 0.1 a 20 μM , se emplearon para el estudio las concentraciones de 5, 6 y 7 $\mu\text{g/mL}$, debido a que a bajas concentraciones del fármaco, podría perderse una alta afinidad y a una alta concentración del fármaco, podría ocurrir la saturación de los sitios de unión a proteínas, lo cual es de importancia en la etapa de desarrollo del fármaco para determinar de manera adecuada el margen de seguridad para estudios toxicocinéticos realizados en modelos animales.^{4, 22-23, 50}

Como se observa en la tabla 22, en el nivel de concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo un valor promedio del porcentaje de unión a fármacos (ver anexo II) comparable con los resultados reportados en la literatura empleando el mismo dispositivo de diálisis, es decir, de 71.8 %¹⁴ con un coeficiente de variación de 3.99 %; mientras que, si se observan los porcentajes de fármaco unido a albúmina para los otros dos niveles de concentración, son parecidos al valor teórico, con excepción de dos repeticiones, para los cuales se obtuvo un coeficiente de variación mayor al 15 %.

Tabla 22. Datos obtenidos en la determinación del grado de unión de sulfametoxazol n=9.

Concentración inicial	Inserto	Concentración en SA	Concentración en albúmina	%Fármaco libre	%Fármaco unido	Promedio	CV
5 µg/mL	1	1.569	2.440	26.461	73.539	70.707	3.990
	2	1.661	2.463	29.313	70.687		
	3	1.575	2.242	32.104	67.896		
6 µg/mL	1	1.918	2.639	34.763	65.237	57.051	24.259
	2	1.839	2.517	35.157	64.843		
	3	1.867	2.128	58.929	41.071		
7 µg/mL	1	2.044	3.135	27.236	72.764	61.363	26.508
	2	2.150	2.471	57.264	42.736		
	3	2.030	2.916	31.411	68.589		

En los casos en los que el criterio de aceptación no es alcanzado, estos datos son rechazados y se analizan las posibles causas de la alta variabilidad en donde, si se rechazaran los datos del control, también se tendrían que rechazar los datos del compuesto de prueba, algunas causas pueden estar relacionadas con que el estado de equilibrio no sea alcanzado, debido a las propiedades fisicoquímicas del compuesto como baja solubilidad, inestabilidad y alta unión no específica, o a retos bioanalíticos como poca sensibilidad.^{12, 20, 23} La variabilidad obtenida en los niveles de 6 y 7 µg/mL se atribuye a la imprecisión en la transferencia de la solución del analito a los insertos debida a la formación de burbujas a los pocillos ya que éstas podrían modificar el estado de equilibrio en el estudio. Tomando en cuenta lo anterior, lo más recomendable sería considerar aumentar el número de réplicas por experimento en futuros estudios de tres a por lo menos cinco repeticiones.

9. CONCLUSIONES

Mediante el presente estudio de unión a proteínas, se logró implementar la metodología estandarizada para la determinación del grado de unión a proteínas por el método de diálisis al equilibrio, dentro del Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la FES Zaragoza, el cual podrá ser utilizado como un control para porcentaje de unión a proteínas de fármacos ya conocidos para futuros estudios de unión a proteínas que se desarrollen en el mismo laboratorio.

En esta metodología se establecieron como condiciones preliminares, el trabajo durante el estudio con los insertos cubiertos con cinta de sellado, 37 °C como temperatura de incubación, una velocidad de agitación de 995 rpm, una solución amortiguadora de diálisis 0.064 M, pH 7.4, un porcentaje de disolvente presente en las muestras de diálisis de no más del 1.25 %, un mínimo de 5 réplicas de las muestras por experimento, y una concentración de albúmina de 8 mg/mL para sulfametoxazol. Sin embargo, es importante mencionar que es necesario considerar las propiedades fisicoquímicas del fármaco ya que en los casos en los que debido a estas la determinación del porcentaje de unión a proteínas resulta un reto, se puede optar por variaciones de la técnica como el método de dilución.

10. REFERENCIAS

1. Tozer TN, Rowland M. Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics: the quantitative basis of drug therapy. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
2. Wasan KM, Cassidy SM. Role of plasma lipoproteins in modifying the biological activity of hydrophobic drugs. *J. Pharm. Sci.* 1998; 87(4): 411-424.
3. Tozer TN, Rowland M. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
4. Shargel L, Yu Andrew BC. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics 3^a ed. Norwalk, Connecticut: Appleton & lange; 1993.
5. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys.* 2000; 1482(1-2): 157-171.
6. Colmenarejo G, Alvarez-Pedraglio A, Lavandera JL. Cheminformatic models to predict binding affinities to human serum albumin. *J. Med. Chem.* 2001; 44(25): 4370-4378.
7. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature.* 1992; 358(6383): 209-215.
8. Burton LL, Chabner BA, Knollmann BC editores. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12^a ed. México: McGraw-Hill; 2012.
9. Schmidt S, González D, Derendorf H. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of pharmaceutical sciences* 2010; 99(3): 1107-1122.

10. Smith DA, Di L, Kerns EH. The effect of plasma protein binding on *in vivo* efficacy: Misconceptions in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(12): 929–939.
11. Wagner JG. *Farmacocinética clínica.* Barcelona: Reverté; 1983.
12. Riccardi K, Cawley S, Yates PD, Chang C, Funk C, Niosi M, et al. Plasma Protein Binding of Challenging Compounds. *Journal Of Pharmaceutical Sciences.* 2015; 104(8): 2627-2636.
13. Ascenzi P, Fanali G, Fasano M, Pallottini V, Trezza V. Clinical relevance of drug binding to plasma proteins. *Journal Of Molecular Structure.* 2014; 1077: 4-13.
14. Waters NJ, Jones R, Williams G, Sohal B. Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *Journal Of Pharmaceutical Sciences.* 2008; 97(10): 4586-4595.
15. Lindup W E, Orme MC. Clinical pharmacology: plasma protein binding of drugs. *British medical journal.* 1981; 282(6259): 212-214.
16. Hall LM, Hall LH, Kier LB. Modeling drug albumin binding affinity with e-state topological structure representation. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003; 43(6): 2120-2128.
17. Gillette JR. Factors affecting drug metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1971; 179(1): 43-66.
18. Liu X, Chen C, Hop CE. Do we need to optimize plasma protein and tissue binding in drug discovery? *Curr Top Med Chem.* 2011;11(4):450-466.
19. Lombardo F, Obach RS, Shalaeva MY, Gao F. Prediction of volume of distribution values in humans for neutral and basic drugs using physicochemical

- measurements and plasma protein binding data. *J. Med. Chem.* 2002; 45(13): 2867-2876.
20. Wang H, Zrada M, Anderson K, Katwaru R, Harradine P, Choi B, et al. Understanding and reducing the experimental variability of in vitro plasma protein binding measurements. *Journal of pharmaceutical sciences.* 2014; 103(10): 3302-3309.
21. Ye Z, Zetterberg C, Gao H. Automation of plasma protein binding assay using rapid equilibrium dialysis device and Tecan workstation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2017; 140: 210-214.
22. Howard M, Hill JJ, Galluppi GR, McLean MA. Plasma protein binding in drug discovery and development. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening.* 2010; 13(2): 170-187.
23. Di L, Breen C, Chambers R, Eckley S, Fricke R, Ghosh A, et al. Industry Perspective on Contemporary Protein-Binding Methodologies: Considerations for Regulatory Drug-Drug Interaction and Related Guidelines on Highly Bound Drugs. *Journal Of Pharmaceutical Sciences.* 2017; 106(12): 3442-3452.
24. Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clinical Pharmacology And Therapeutics.* 2002; 71(3): 115-121.
25. Heuberger J, Schmidt S, Derendorf H. When is protein binding important? *Journal Of Pharmaceutical Sciences.* 2013; 102(9): 3458-3467.
26. Hinderling PH, Hartmann D. The pH dependency of the binding of drugs to plasma proteins in man. *Therapeutic Drug Monitoring* 2005; 27(1): 71-85.

27. Rowland Yeo K, Aarabi M, Jamei M, Rostami-Hodjegan A. Modeling and predicting drug pharmacokinetics in patients with renal impairment. *Expert Review Of Clinical Pharmacology*. 2011; 4(2): 261-274.
28. Vanholder R, De Smet R, Ringoir S. Factors influencing drug protein binding in patients with end stage renal failure. *European Journal Of Clinical Pharmacology*. 1993; 44(1): S17-S21.
29. Vanholder R, Van Landschoot N, De Smet R, Schoots A, Ringoir S. Drug protein binding in chronic renal failure: evaluation of nine drugs. *Kidney Int*. 1988; 33(5): 996-1004.
30. Ji Z, Yuan H, Liu M, Hu J. ¹H-NMR study of the effect of acetonitrile on the interaction of ibuprofen with human serum albumin. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*. 2002; 30(1): 151-159.
31. Di L, Umland JP, Trapa PE, Maurer TS. Impact of recovery on fraction unbound using equilibrium dialysis. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 101(3): 1327-1335.
32. Mofat AC, Osselton D, Widdop B. Clarke's Analysis of drug and poisonings in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4th ed. London: Pharmaceutical Press; 2011.
33. Sweetman SC. Martindale: The complete drug reference. 36th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009.
34. Florey K. Analytical profiles of drug substances. Vol. 2. USA: Academic Press; 1973.
35. Hernández Abad VJ, Sánchez González EG, Vázquez Lira JC, Mora Guevara JLA, Mendoza Mata MT. Introducción a las técnicas cromatográficas

- instrumentales más utilizadas en el Análisis Farmacéutico. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2008.
36. Moldoveanu SC, David V. Essentials in modern HPLC separations. Waltham Massachusetts: Elsevier; 2012.
37. Ahuja S, Rasmussen H (eds.). Separation Science and Technology volumen 8 HPLC Method Development for Pharmaceuticals. Italia: Academic Press; 2007.
38. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. J. Chromatogr. A. 2003; 987 (1-2): 57-66.
39. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 11ª edición. Ciudad de México: Secretaría de Salud; 2014.
40. Hernández Abad VJ, Sánchez González EG. Introducción a la validación de métodos analíticos para el laboratorio farmacéutico de control de calidad. Ciudad de México: Universidad Nacional autónoma de México: Facultad de estudios Superiores Zaragoza; 2017.
41. Wayne WD. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. Ciudad de México: Editorial Limusa; 2002.
42. Hernández Abad VJ, Mora Guevara JLA, Sánchez Ruiz JF. Validación de Métodos Analíticos. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Estudios superiores Zaragoza; 2006.

- 43.Center for Drug Evaluation and Research. (2013). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. United States Department of Health and Human Services. Rockville, Maryland.
- 44.International Conference of Harmonization, Q2(R1) Harmonized Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and methodology; 2005.
- 45.Secretaría de Salud. 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 pruebas de biocomparabilidad. Ciudad de México: Secretaría de Salud; 2013.
- 46.Medina Reyes LJ, García Aguirre LJ. Estudios de unión a proteínas plasmáticas del albendazol y su principal metabolito, sulfóxido de albendazol. Tesis de licenciatura. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1995.
- 47.Mapleson W. Computation of effect of Donnan Equilibrium on pH in Equilibrium Dialysis. J. Pharm. Methods. 1987; 17 (3): 231-242.
48. Huang JD, Errors in estimating the unbound fraction of drugs due to the volumen of Shift in equilibrium dialysis, J Pharm. Sci. 1983; 72 (11): 1368-1369.
- 49.Zamek-Gliszczyński MJ, Ruterbories KJ, Ajamie RT, Wickremsinhe ER, Pothuri L, Rao MVS, et al. Validation of 96-well equilibrium dialysis with non-radiolabeled drug for definitive measurement of protein binding and application to clinical development of highly-bound drugs. J Pharm Sci. 2011;100(6):2498-2507.

50. Zhang F, Xue J, Shao J, Jia, L. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug discovery today*, 2012; 17(9-10): 475-485.

11. ANEXO I. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

11.1 Solución amortiguadora de fosfatos (SA) pH 3, 0.005 M

Colocar 0.596074 g de fosfato de potasio monobásico anhidro en un vaso de precipitados, adicionar aproximadamente 500 mL de agua desionizada y disolver, adicionar el agua restante para completar un volumen de 1 L, adicionar 32 μL de ácido fosfórico, homogeneizar con un agitador magnético. Medir el pH, de ser necesario ajustar a pH 3 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico 0.1 N.

10.2. Solución amortiguadora de fosfatos (SA) pH 3, 0.005 M + Dietilamina 10^{-4} M

Colocar 0.596074 g de fosfato de potasio monobásico anhidro en un vaso de precipitados, adicionar aproximadamente 500 mL de agua desionizada y disolver, adicionar el agua restante para completar un volumen de 1 L, adicionar 32 μL de ácido fosfórico, homogeneizar con un agitador magnético. Medir el pH, de ser necesario ajustar a pH 3 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico 0.1 N. Adicionar 10.4 μL de dietilamina, homogeneizar con un agitador magnético, verificar el pH.

10.3. Ácido acético glacial en metanol al 1%

Verter aproximadamente 30 mL de metanol grado HPLC a una probeta, adicionar 0.5 mL de ácido acético glacial, completar el volumen con metanol hasta 50 mL, agitar.

10.4. Solución amortiguadora (SA) de fosfatos pH 7.4 0.064 M para diálisis

Verter 50 mL de agua desionizada en una probeta. Disolver en un vaso de precipitados 0.16846 g de fosfato de potasio monobásico y 0.34174 g de fosfato de potasio dibásico,

medir el pH y, de ser necesario ajustar a pH 7.4 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico 0.1 N.

10.5. Solución de albúmina a 8 mg/mL

Adicionar 400 mg de albúmina a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar aproximadamente 30 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, colocar el tapón del matraz y sonicar por dos minutos, aforar y homogeneizar.

10.6. Fase móvil Metanol-SA de fosfatos 0.005 M, pH 3, 30:70 + Dietilamina 10^{-4} M (100 mL)

Adicionar a una probeta 30 mL de metanol y 70 mL de SA de fosfatos 0.005 M, pH 3 + dietilmina 10^{-4} M, homogeneizar con un agitador magnético, filtrar a vacío y sonicar por 30 minutos.

10.7. Desarrollo del método analítico

10.7.1. Solución Stock del fármaco

Adicionar 12.5 mg de sulfametoxazol o trimetoprima a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y aforar con metanol grado HPLC, homogeneizar.

10.7.2. Solución de fármaco a 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$

Adicionar con una micropipeta las correspondientes alícuotas de solución Stock del fármaco como se indica en la tabla 23, a matraces volumétricos de 10 mL, aforar con fase móvil, homogeneizar.

Tabla 23. Preparación de muestras de fármaco a 10 y 50 µg/mL.

Alícuota de sol. Stock	Aforo con fase móvil	Concentración final
200 µL	10 mL	10 µg/mL
1000 µL	10 mL	50 µg/mL

10.8. Optimización del método

10.8.1. Solución de trimetoprima a 20 µg/mL en fase móvil

Adicionar 400 µL de solución stock de trimetoprima preparada como se indica en el punto 10.7.1 a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con fase móvil (punto 10.6), homogeneizar.

10.8.2. Solución Stock de sulfametoxazol (800 µg/mL)

Adicionar 8 mg de sulfametoxazol a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con metanol grado HPLC, homogeneizar.

10.8.3. Solución Stock de trimetoprima (400 µg/mL)

Adicionar 4 mg de trimetoprima a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con metanol grado HPLC, homogeneizar.

10.8.4. Solución de sulfametoxazol a 5 µg/mL en albúmina

Adicionar 62.5 µL de la solución stock de sulfametoxazol a 800 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con solución de albúmina a 8 mg/mL, evitando la formación de burbujas.

10.8.5. Solución del estándar interno (SI) trimetoprima a 10 µg/mL en solución de ácido acético-metanol al 1%

Adicionar 250 μL de solución stock de trimetoprima a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con solución de ácido acético-metanol al 1%.

10.9. Validación del método analítico

10.9.1. Soluciones de sulfametoxazol para la curva de calibración

Preparar por triplicado cada nivel de concentración, adicionando con una micropipeta la alícuota correspondiente de solución Stock (punto 10.8.2) de acuerdo con la tabla 24 a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con fase móvil.

Tabla 24. Preparación de soluciones para curva de calibración.

Alícuota de sol. Stock	Aforo con fase móvil	Concentración final
12.5 μL	10 mL	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
37.5 μL	10 mL	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
62.5 μL	10 mL	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
87.5 μL	10 mL	7 $\mu\text{g}/\text{mL}$
125 μL	10 mL	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

10.9.2. Precisión del sistema

Preparar por sextuplicado muestras de sulfametoxazol a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como se indica en el punto 10.8.4.

10.10. Validación del método analítico

10.10.1. Solución Stock de sulfametoxazol para límite de cuantificación

Adicionar 4 mg de sulfametoxazol a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con metanol grado HPLC, homogeneizar.

10.10.2. Solución de sulfametoxazol a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Adicionar a n matraz volumétrico de 10 mL, 1000 µL de solución stock, aforar con metanol HPLC, homogeneizar.

10.10.3. Límite de cuantificación

Preparar por triplicado muestras de sulfametoxazol, adicionando la alícuota correspondiente de solución stock de sulfametoxazol (punto 10.10.1) para las concentraciones de 0.05-0.5 µg/mL o de solución de sulfametoxazol a 40 µg/mL para las concentraciones de 0.75 y 1 µg/mL, como se indica en la tabla 25 a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con solución de albúmina a 8 mg/mL, homogeneizar.

Tabla 25. Preparación de muestras para límite de cuantificación.

Alícuota de sulfametoxazol en metanol	Aforo con albúmina	Concentración final
12.5 µL	10 mL	0.05 µg/mL
25 µL	10 mL	0.1 µg/mL
37.5 µL	10 mL	0.15 µg/mL
62.5 µL	10 mL	0.25 µg/mL
125 µL	10 mL	0.5 µg/mL
18.5 µL	10 mL	0.74 µg/mL
25 µL	10 mL	1 µg/mL

10.10.4. Linealidad del método

Preparar por triplicado cada nivel de concentración adicionando la alícuota correspondiente de solución stock de sulfametoxazol (punto 10.8.2) como se muestra en la tabla 26 a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con solución de albúmina y homogeneizar.

Tabla 26. Preparación de muestras para linealidad del método.

Alícuota de sol. Stock	Aforo con albúmina	Concentración final
12.5 µL	10 mL	1 µg/mL
37.5 µL	10 mL	3 µg/mL
62.5 µL	10 mL	5 µg/mL
87.5 µL	10 mL	7 µg/mL
125 µL	10 mL	10 µg/mL

10.10.5. Precisión del método

- **Repetibilidad**

Preparar por triplicado muestras de sulfametoxazol adicionando la correspondiente alícuota de solución stock (punto 10.8.2) como se indica en la tabla 27 a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con solución de albúmina, homogeneizar.

Tabla 27. Preparación de muestras para repetibilidad.

Alícuota de sol. Stock	Aforo con sol. Albúmina	Concentración final
50 µL	10 mL	4 µg/mL
62.5 µL	10 mL	5 µg/mL
75 µL	10 mL	6 µg/mL

- **Precisión intermedia**

Muestras de sulfametoxazol a 5 µg/mL en albúmina (punto 10.8.4) preparadas por triplicado por dos analistas en dos días diferentes.

10.10.6. Exactitud

Preparar por triplicado muestras de sulfametoxazol adicionando la correspondiente alícuota de solución stock (punto 10.8.2) como se indica en la tabla 28 a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con solución de albúmina, homogeneizar.

Tabla 28. Preparación de muestras para exactitud.

Alícuota de sol. Stock	Aforo con sol. Albúmina	Concentración final
12.5 µL	10 mL	1 µg/mL
50 µL	10 mL	4 µg/mL
62.5 µL	10 mL	5 µg/mL
75 µL	10 mL	6 µg/mL

10.10.7. Estabilidad de la muestra

Preparar por triplicado muestras de sulfametoxazol a 5 µg/mL en albúmina (punto 10.8.4).

11. Estudio de unión a proteínas

11.1. Etanol a l 20%

Adicionar a una probeta 400 mL de agua desionizada y completar un volumen de 500 mL con etanol absoluto, homogeneizar.

11.2. Muestras para diálisis al equilibrio

Preparar por triplicado cada nivel de concentración adicionando la alícuota correspondiente de solución stock de sulfametoxazol (punto 10.8.2), como se indica en la tabla 29 a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con solución de albúmina, homogeneizar.

Tabla 29. Preparación de muestras para diálisis al equilibrio.

Alícuota de sol. Stock	Aforo con sol. Albúmina	Concentración final
62.5 µL	10 mL	5 µg/mL
75 µL	10 mL	6 µg/mL
87.5 µL	10 mL	7 µg/mL

12. ANEXO II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

12.1 Promedio

Para un conjunto de datos x_1, x_2, \dots, x_n o y_1, y_2, \dots, y_n

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \text{ ó } \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

Donde:

x_i es la variable independiente.

y_i es la variable dependiente.

12.2 Desviación estándar (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y} - y)^2}{n - 1}}$$

11.3 Coeficiente de variación (CV)

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

11.4 Pendiente (m)

$$m = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - (\sum_{i=1}^n x_i)(\sum_{i=1}^n y_i)}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}$$

11.5 Ordenada al origen (b)

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} - m \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

11.6 Desviación estándar de los residuales –y ($S_{y/x}$)

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Donde:

y_i es la variable de respuesta.

\hat{y}_i es el valor estimado de la variable de respuesta, obtenido de la ecuación de la recta.

11.7 Desviación estándar de la pendiente de la recta de regresión (S_m)

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}}$$

11.8 Desviación estándar de la ordenada al origen de la recta de regresión

(S_b)

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}\right)^2}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}}$$

11.9 Coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = \frac{m^2 \left[\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n} \right]}{\sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n}}$$

11.10 Estadígrafo t de Student para comparación entre una media encontrada y un valor teórico

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{n}}}$$

Donde:

\bar{y} es el promedio de la variable de respuesta.

μ es el valor teórico de la media contra la que se comparan los resultados obtenidos.

S es la desviación estándar de la serie de datos.

N es el número de datos utilizados para realizar los cálculos.

11.12 Intervalo de confianza para el estadígrafo t de Student (IC)

$$IC = \bar{y} \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} S$$

11.13 Análisis de varianza (ANADEVA) para linealidad del sistema y el método

Tabla 30. ANADEVA para linealidad del sistema y el método.

Factor de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc
Regresión	1	SCR	$MCR = SCR$	$\frac{MCR}{MCER}$
Error de regresión	n-2	SCER	$MCER = \frac{SCER}{n-2}$	

Donde:

SCR= Suma de cuadrados de regresión.

$$SCR = m^2 \left[\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right]$$

SCER= Suma de cuadrados del error de regresión.

$$SCER = \sum Y_i^2 - m \sum X_i Y_i - b \sum Y_i$$

SCT= Suma de cuadrados del total.

$$SCT = \sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}$$

11.14 Análisis de varianza (ANADEVA) de dos factores para precisión intermedia

Modelo estadístico: $y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + e_{k(ij)}$

Donde:

y_{ijk} = k-ésima observación obtenida por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.

μ = Media poblacional de las observaciones obtenidas aplicando el método analítico.

A_i = Efecto del i-ésimo analista en el resultado analítico.

D_j = Efecto del j-ésimo día en el resultado analítico.

AD_{ij} = Efecto de la interacción del i-ésimo analista en el j-ésimo día de la respuesta analítica.

$e_{k(ij)}$ = Error experimental de la k-ésima observación realizada por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.

Tabla 31. ANADEVVA para precisión intermedia.

Fuente de variación	Grados de libertad gl	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F tablas
Analista	(i-1)	SC _A	$MC_A = \frac{SC_A}{gl_A}$	$\frac{MC_A}{MC_e}$	F _(α/2, glA, gle) – F _(1-α/2, glA, gle)
Día	(j-1)	SC _D	$MC_D = \frac{SC_D}{gl_D}$	$\frac{MC_D}{MC_e}$	
Interacción analista-día	(i-1)(j-1)	SC _{AD}	$MC_{AD} = \frac{SC_{AD}}{gl_{AD}}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_e}$	
Error	(k-1)(ij)	SC _e	$MC_e = \frac{SC_e}{gl_e}$		

Donde:

i=número de analistas.

j= número de días.

k= número de réplicas por cada combinación de los factores analista-día.

SC_A= Suma de cuadrados del analista.

$$SC_A = \frac{\sum_{i=1}^n y_{i..}^2}{jk} - \frac{y_{...}^2}{ijk}$$

$\sum_{i=1}^n y_{i..}^2$ = Sumatoria elevada al cuadrado de los datos obtenidos para cada analista sin importar día o réplica.

$y_{...}^2$ = Cuadrado de la sumatoria de todos los valores obtenidos.

SC_D= Suma de cuadrados del día.

$$SC_D = \frac{\sum_{j=1}^n y_{.j.}^2}{ik} - \frac{y_{...}^2}{ijk}$$

$\sum_{j=1}^n y_{.j.}^2$ = Sumatoria elevada al cuadrado de los datos obtenidos para cada día sin importar analista o réplica.

SC_{AD}= Suma de cuadrados de analista-día.

$$SC_{AD} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n y_{ij}^2}{k} - \frac{\sum_{i=1}^n y_{i..}^2}{jk} - \frac{\sum_{j=1}^n y_{.j.}^2}{ik} + \frac{y^2}{ijk}$$

$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n y_{ij}^2$ = Sumatoria elevada al cuadrado de los datos obtenidos para cada combinación analista-día sin importar la réplica.

SC_e= Suma de cuadrados del error.

$$SC_e = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n y_{ijk}^2 - \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n y_{ij.}^2}{k}$$

$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n y_{ijk}^2$ = Sumatoria del cuadrado del valor de cada resultado analítico.

11.15. Fracción diluida (f_d)

$$f_d = \frac{\text{Concentración en SA}}{\text{Concentración en albúmina}}$$

11.16. Fracción no diluida (f_{nd})

$$f_{nd} = \frac{1/D}{\left((1/f_d) - 1 \right) + 1/D}$$

Donde:

D= Factor de dilución de la solución de albúmina.

11.17. Porcentaje de fármaco libre (%F_{Libre})

$$\%F_L = \left(\frac{\text{Concentración en SA}}{\text{Concentración en albúmina}} \right) * 100$$

11.18. Porcentaje de fármaco unido a proteínas (%F_{unido})

$$\%F_{unido} = 100\% - \%F_{Libre}$$

11.19. Porcentaje de concentración de fármaco libre (%C_{FL})

$$\%C_{FL} = \frac{\text{concentración en SA} * 100}{\text{Concentración inicial}}$$