



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**Unidad Xochimilco**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO (CLAR) PARA CUANTIFICAR SULFADIAZINA Y LINEZOLIDA EN BIO-MOF.**

**PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE A:**

**EVALUACIÓN DE PRODUCTOS RELACIONADOS CON LA SALUD.**

**ALUMNO: JORGE LUIS IBARRA BELLO**

**MATRICULA: 2143024115**

**ASESORES:**

**ASESOR INTERNO: DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA.**

**ASESOR EXTERNO: M. en C.F. JAVIER ÁGUILA ROSAS.**

**LUGAR DE REALIZACIÓN: LABORATORIO DE FARMACIA MOLECULAR Y LIBERACIÓN CONTROLADA N-106, UAM-X.**

**FECHA DE INICIO DEL PROYECTO: 24 DE SEPTIEMBRE 2018**

**FECHA DE TÉRMINO DEL PROYECTO: 29 DE MARZO 2019**

**OCTUBRE 2019**

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
OBJETIVOS.....	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	10
Desarrollo y Validación del Método analítico para Sulfadiazina (SDZ).....	10
Linealidad .....	10
Límite Inferior de Cuantificación.....	11
Precisión y Exactitud.....	11
Selectividad.....	12
Repetibilidad.....	12
Reproducibilidad.....	13
Estabilidad a largo plazo .....	13
Carga Total SDZ.....	13
Desarrollo y Validación del Método analítico para Linezolid (LNZ).....	13
Linealidad.....	14
Límite Inferior de Cuantificación.....	15
Precisión y Exactitud.....	15
Selectividad.....	16
Repetibilidad.....	16
Reproducibilidad.....	16
Estabilidad a largo plazo .....	16

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	16
Resultados para Sulfadiazina (SDZ).....	17
Linealidad.....	19
Límite Inferior de Cuantificación.....	21
Precisión y Exactitud.....	22
Selectividad.....	22
Repetibilidad.....	25
Reproducibilidad.....	26
Estabilidad a largo plazo.....	27
Carga Total SDZ.....	29
Resultados de Linezolida (LNZ).....	30
Linealidad.....	32
Límite Inferior de Cuantificación.....	34
Precisión y Exactitud.....	35
Selectividad.....	36
Repetibilidad.....	37
Reproducibilidad.....	38
Estabilidad a largo plazo.....	38
OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS.....	39
CONCLUSIONES.....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
RESUMEN.....	45

## INTRODUCCIÓN

En los años recientes la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable y ha surgido como un problema de consecuencias impredecibles la resistencia a estos por la aparición de mecanismos defensivos en las bacterias, virus, hongos y protozoarios, con los que evaden la acción destructiva de estas sustancias. La principal causa que ha dado pie a este problema emergente es el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos y la pérdida de su efectividad frente a múltiples microorganismos (*Fernández Riverón et al., 2003*)

El aumento de la resistencia a los antibióticos clásicos surgida en los últimos años ha dado paso a la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías frente a los microorganismos más resistentes (*García, 2001*). Las primeras moléculas utilizadas con actividad antimicrobiana fueron las sulfas, que, a pesar de la aparición de diversos antimicrobianos, éstas se han mantenido en el mercado para atender patologías particulares. Actualmente surgen las oxazolidinonas, un nuevo grupo de antimicrobianos sintéticos, cuyo primer principio activo comercializado es la Linezolida (LNZ) (*Wilhelm & Villena, 2012*).

Sulfadiazina (SDZ) y Linezolida (LNZ) son fármacos que presentan una actividad bactericida de amplio espectro; lo cual los hace idóneos como medicamentos de primera elección en el tratamiento de infecciones bacterianas que afectan a pacientes que sufren de quemaduras y otras lesiones cutáneas (*Prats, 2017*). Sin embargo, su forma de dosificación y actividad se ve favorecida con el uso de nuevas tecnologías aplicadas para el transporte de fármacos (*Lemus & Goerne, 2012*). Una de estas tecnologías es el uso de las Bio-MOF (Metal-Organic Framework) que son estructuras biocompatibles de redes híbridas formadas por el autoensamblaje de iones metálicos y grupos de enlaces orgánicos multifuncionales (*Horcajada et al., 2012*).

En el presente informe se desarrolló y validó un método analítico cromatográfico CLAR destinado a la evaluación del contenido de fármaco en la Bio-MOF, ya que dicha técnica analítica es una herramienta muy empleada debido a su alta capacidad de separación y especificidad, así como por su utilidad en la identificación y; cuantificación de fármacos (Skoog, 2014); siendo capaz de determinar concentraciones de los fármacos libres y adsorbidos o absorbidos en Bio-MOF. El método analítico desarrollado cumple con los parámetros analíticos de validación establecidos por la normatividad nacional; para la cuantificación de los fármacos antes mencionados, cuando forman parte de los Bio-MOF que se desarrollaron en el Instituto de Investigación de Materiales de la Facultad de Química de la UNAM, en conjunto con el laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-Xochimilco.

## MARCO TEÓRICO

### Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAR)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es la técnica de separación más ampliamente utilizada. Las razones que han otorgado la popularidad a esta técnica de separación son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria. En la figura 1 se observan los principios y condiciones aplicados a la cromatografía de líquidos en muchos campos de la ciencia. Algunos ejemplos de sustancias identificadas son los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, especies organometálicas y una amplia variedad de sustancias inorgánicas. (Skoog *et al.*, 2008)

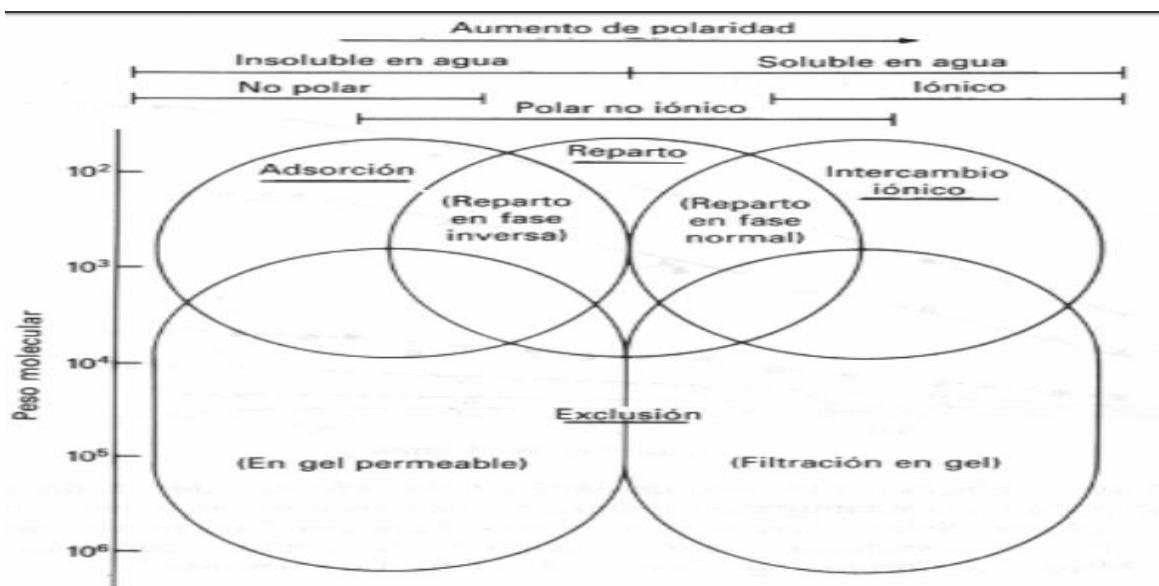


Figura 1. Aplicaciones de la cromatografía de líquidos (Cfr. Skoog *et al.*, 2008).

### Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación. La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación en cuestión.

La validación de métodos es un requisito importante en la práctica del análisis químico. Hoy en día la validación de métodos analíticos es importante ya que el concepto de validación hace referencia a

la evidencia documentada que demuestra que los resultados que se están obteniendo de un método analítico en particular son fiables y adecuados para su finalidad y propósito perseguido ya que la toma de decisiones está basada en la información que estos resultados nos proporcionan. Así, validar un método consiste en verificar y documentar su validez o eficacia, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos por el usuario para dar una correcta solución a un problema analítico particular; siendo estos requisitos los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer un método a utilizar para resolver el problema analítico. (Cuba, 2013)

### Bio-MOF'S

La síntesis de nuevos compuestos o estructuras con actividad portadora de moléculas se ha caracterizado principalmente por iniciar con sustancias o materiales generados a partir de síntesis orgánica e inorgánica, siendo de alto peso molecular y una baja solubilidad acuosa. Suelen ser sistemas que permiten un mejor control de la biodisponibilidad de fármacos a nivel plasmático, aumentando la eficiencia y disminuyendo la toxicidad; así como un aumento de la estabilidad y protección de la biodegradación de medicamentos. De tal forma recientemente se ha propuesto el uso de nuevas tecnologías aplicadas para el transporte de fármacos teniendo como característica principal la combinación de un alto volumen de porosidad regular, así como la presencia de grupos orgánicos ajustables que facilitan la uniformidad en el tamaño de los poros. Una de estas tecnologías es el uso de las Bio-MOF (Metal-Organic Framework) que son estructuras de redes híbridas formadas por el autoensamblaje de iones metálicos y grupos de enlaces orgánicos multifuncionales biocompatibles. La familia MIL-53 (fig. 2), son Bio-MOF que se han empleado para realizar cargas de fármaco como el ibuprofeno; especialmente MIL-53 (Cr), MIL-53 (Fe) y MIL-53 (Al). (Horcajada, S erre, Guillaume, & Francisco., 2008)

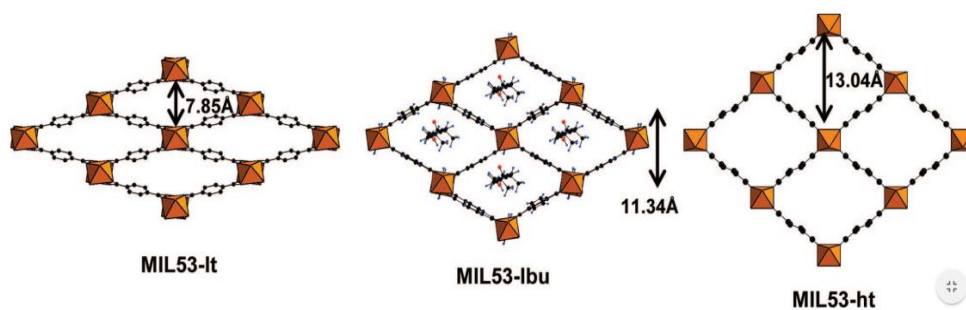


Figura 2. Estructura de Bio-MOF MIL-53 (Cr) cargado con Ibuprofeno, deshidratación-hidratación.

El Bio-MOF “ZIF-8” es un compuesto poroso cristalino compuesto por iones metálicos y orgánicos que ofrece una buena funcionalización por su estructura esférica cristalina, además de tener una buena afinidad por fármacos y una liberación controlable de los mismos. Las nano esferas del ZIF-8 (Fig. 3) poseen un tamaño de 70 nm que es óptimo para la toma celular y estable en condiciones fisiológicas acuosas. La carga del fármaco se da de forma suave y se puede controlar variando la cantidad del activo durante la síntesis. Las nano esferas del ZIF-8 están compuestas por 2-metilimidazolato e iones de zinc.(Zhuang *et al.*, 2014)

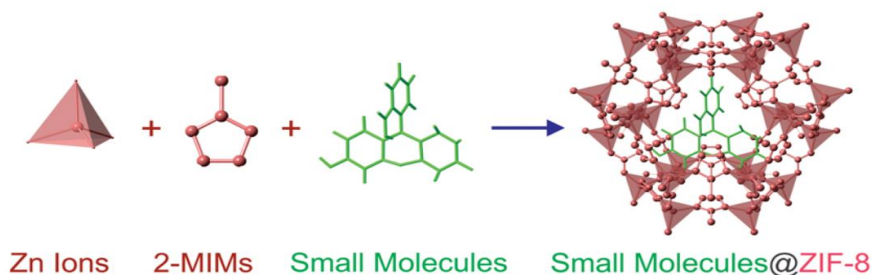


Figura 3. Encapsulación de moléculas pequeñas durante la síntesis de nano esferas ZIF-8.

### Propiedades Físicoquímicas de la Sulfadiazina (SDZ)

Entre los antibióticos, la sulfadiazina (SDZ) y los compuestos denominados genéricamente “sulfas”, constituyen un grupo de agentes antibacterianos sintéticos que contienen el grupo sulfonamida ( $R_1-SO_2-NH-R_2$ ). Se utilizan en la medicina humana y son una de las clases más vendidas de compuestos antimicrobianos por su bajo costo y amplio espectro de actividad antibacteriana y anticóccida.(Sharma *et al.*, 2019)

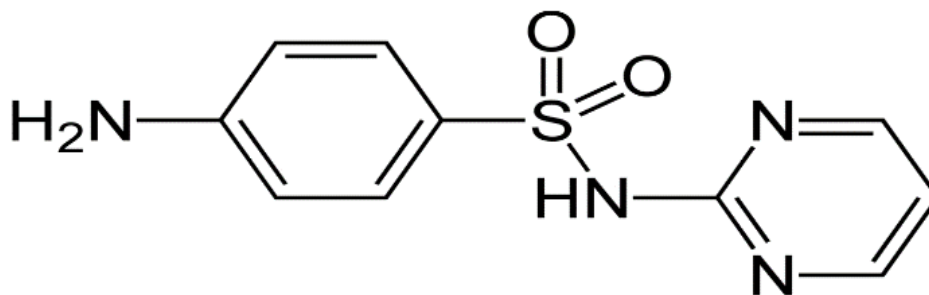


Figura 4. Estructura Química de la Sulfadiazina.

Las propiedades fisicoquímicas de la sulfadiazina se muestran en la tabla 1 (Borges, 2005).

**Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la sulfadiazina (SDZ)**

PROPIEDAD	DESCRIPCIÓN
Nombre (IUPAC) sistemático	4-Amino-N-2-pirimidinil-bencenosulfonamida; N1- (2-pirimidinil) -sulfanilamida.
Formula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S
Peso molecular	250.27 g/mol
Punto de fusión	253-265°C
Densidad	1.496 g/cm <sup>3</sup>
Aspecto	Polvo blanco o ligeramente amarillo, inodoro. Estable al aire, pero se oscurece cuando se expone a la luz
Solubilidad	1 gramo se disuelve en 13 litros de agua, escasamente soluble en alcohol y acetona. Soluble en soluciones de hidróxido de sodio y potasio.

### Propiedades Fisicoquímicas de la Linezolid (LNZ)

La linezolid es una oxazolidinona que tiene utilidad clínica en el tratamiento de infecciones causadas por aerobios gran-positivos, inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas a través de un mecanismo de acción diferente al de otros agentes antibacterianos; esto le brinda la capacidad de ser administrada en cepas resistentes a los demás antibióticos ya existentes. (Pfizer, 2005)

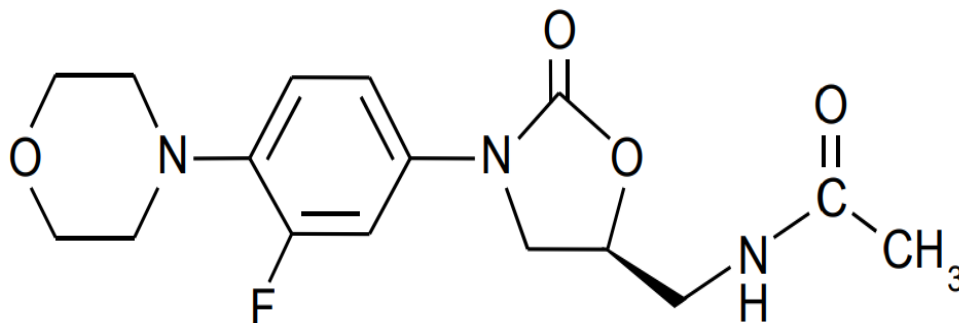


Figura 5. Estructura Química de la Linezolid.



Las propiedades fisicoquímicas de la Linezolida se muestran en la tabla 2 (Pfizer, 2005).

**Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la Linezolida (LNZ)**

<b>PROPIEDAD</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Nombre (IUPAC) sistemático	(S)-N-[[3-[3-Fluoro-4-(4-morfolinil)fenil]-2-oxo-5-oxazolidinilo] metil]-acetamida.
Formula molecular	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Peso molecular	337.346 g/mol
Estado y color	Solido blanquecino
Punto de fusión	181-183°C
Densidad	1.496 g/cm <sup>3</sup>
Aspecto	Polvo blanco
Solubilidad	3 mg en 1ml de agua

## **OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS**

### **Objetivo general**

Adaptar y validar un método analítico cromatográfico (CLAR) para la cuantificación de Sulfadiazina y Linezolida en muestras de Bio-MOF.

### **Objetivos específicos**

Adaptar y validar un método analítico cromatográfico (CLAR) para la cuantificación de Sulfadiazina en muestras de Bio-MOF, a partir de una técnica farmacopéica.

Desarrollar y validar un método analítico cromatográfico (CLAR) para la cuantificación de linezolida, utilizando técnicas publicadas en distintas fuentes bibliográficas.

Desarrollar por parte del prestador del presente proyecto del servicio social, las habilidades analíticas suficientes para aplicar los conocimientos teóricos sobre CLAR en el problema analítico de nuevos acarreadores como los Bio-MOF.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

### Desarrollo y validación del método analítico para SDZ

Previo al análisis se lavó y acondicionó el área de trabajo adecuadamente. Para el desarrollo del método se empleó material volumétrico (pipetas de 0.5, 1, 3 y 2 mL) así como el estándar de Sulfadiazina. Se empleó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.025 N y Buffer de fosfatos pH 7.4

Para efectuar el análisis se utilizó un cromatógrafo automatizado de líquidos marca Agilent Modelo Infinity 1260 con detector UV con arreglo de diodos y una columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, (4.6 x 150 mm), con tamaño de partícula de 2.7  $\mu\text{m}$ ; empleando como fase móvil agua + ácido acético glacial y acetonitrilo (ACN).

### Linealidad

Se preparó una solución stock pesando 12.5 mg de Sulfadiazina y se llevó a un volumen de 25 mL en un matraz volumétrico con hidróxido de sodio (NaOH) a 0.025 N. A partir de esta solución stock se tomaron diversas alícuotas para construir una curva de calibración con 6 niveles correspondientes a una concentración teórica conocida como se muestra en la tabla 3.

Posteriormente se agitó suavemente cada matraz volumétrico y se filtró 1 mL de cada una de las muestras en viales para CLAR con un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y una jeringa. Además, se filtró 1 mL de NaOH 0.025 N en un vial, que se utilizó como blanco para el análisis. Así mismo se preparó un vial de adecuabilidad para verificar la funcionalidad del equipo. La preparación de la curva de calibración se realizó por triplicado.

**Tabla 3. Curva de calibración SDZ**

Punto o Nivel	[ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Alícuota (mL)	Aforo (mL)
1	10	0.5	25
2	25	0.5	10
3	50	0.5	5
4	100	1	5
5	150	3	10
6	200	2	5

Posteriormente se agitó suavemente cada matraz volumétrico y se filtró 1 mL de cada una de las muestras en viales para CLAR con un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y una jeringa. Además, se filtró 1 mL de NaOH 0.025 N en un vial, que se utilizó como blanco para el análisis. Así mismo se preparó un vial de adecuabilidad para verificar la funcionalidad del equipo. La preparación de la curva de calibración se realizó por triplicado.

Previo al análisis también se realizó la preparación de la fase orgánica (Acetonitrilo) y fase acuosa (Agua + Ácido acético glacial) como se indica en la tabla 4.

**Tabla 4. Composición de la fase móvil para el método con SDZ**

Fase	Disolventes grado HPLC
Orgánica	Acetonitrilo 300 mL
Acuosa	Agua 692 mL + 8 mL de ácido acético glacial

\*\* Cada fase se filtró a vacío con el equipo de filtración por membrana con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Las condiciones a las cuales se efectuó el análisis cromatográfico se indican en la siguiente tabla:

**Tabla 5. Condiciones cromatográficas de análisis para SDZ**

Flujo	Volumen de inyección	Temperatura	Longitud de onda	Fase móvil	Fase estacionaria
1.2 mL/min	5 $\mu\text{L}$	25° C	254 nm	88% fase acuosa 12% fase orgánica	Columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, (4.6 x 150 mm), tamaño de partícula de 2.7 $\mu\text{m}$ .

Con los datos obtenidos se realizó el gráfico de cada una de las curvas de calibración y se calculó el coeficiente de variación (CV), la concentración real, y % Error Relativo (% ER).

#### **Límite Inferior de Cuantificación (LIC)**

Se preparó una solución stock pesando 12.5 mg de Sulfadiazina y se llevó a un volumen de 25 mL en un matraz volumétrico con hidróxido de sodio (NaOH) a 0.025 N. Se tomó una alícuota de 0.5 mL y se colocó en un matraz de 25 mL llevando al aforo con NaOH 0.025 N. Se tomó 1 mL y se filtró con membrana y una jeringa en un vial. Se realizaron 5 inyecciones y se calculó concentración real, CV y % ER.

#### **Precisión y Exactitud**

Se preparó una solución stock pesando 20 mg de Sulfadiazina y se llevó a un volumen de 10 mL en un matraz volumétrico con hidróxido de sodio (NaOH) a 0.025 N. Se tomaron alícuotas de 1, 2 y 4 mL correspondientes a concentraciones baja, media y alta (40, 80 y 160  $\mu\text{g/mL}$ ) y se colocaron de manera independiente en un matraz de 25 mL llevando al aforo con NaOH 0.025 N. Se tomó 1 mL

de cada matraz y se filtró con membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y una jeringa en un vial. Se realizaron 5 inyecciones y se calculó concentración real, CV y % ER.

### Selectividad

La selectividad para SDZ se evaluó en presencia de las estructuras Bio-MOF-53 (Al), Bio-MOF 53 (Al/Zn) y el BIO-MOF-ZIF 8 así como; de los materiales que se emplean para la síntesis de las estructuras vacías de acuerdo con la tabla 6.

**Tabla 6. Materias primas empleadas en selectividad para SDZ**

Vial	Materia Prima	Cantidad (mg)	NaOH 0.025 N (mL)	Buffer de Fosfatos pH 7.4 (mL)
1	BDC	6	25	25
2	$\text{Al}_2\text{NO}_3$			
3	$\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$			
4	MOF: Al, BDC			
5	MOF: Al, Zn, BDC			
6	MOF: Zn, BDC			
7	MOF: Al, BDC, SDZ			
8	Al, Zn, BDC, SDZ			
9	Mezcla: vial 1-8			
10	2-MIM			
11	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$			
12	MOF-ZIF8			
13	Mezcla: vial 10-12			
14	Piel de cerdo	3000	30	30

Cada muestra de selectividad se evaluó con NaOH 0.025 N y con Buffer de Fosfatos pH 7.4 y los datos obtenidos se interpolaron en la curva. Además, se colocó como prueba de selectividad el uso de la piel de cerdo, debido a que el método también será aplicado en pruebas de permeabilidad con este tipo de membrana.

### Repetibilidad

La repetibilidad se evaluó en 2 días diferentes realizando la preparación de fases y soluciones stock nuevas para la curva de calibración (triplicado). Se evaluó nuevamente la precisión y exactitud como se mencionó anteriormente. Posterior a ello se realizó el tratamiento de los datos calculando concentración real, CV y % ER.

### Reproducibilidad

La reproducibilidad se evaluó en 2 días diferentes por otro analista realizando toda la validación del método. La fase móvil y las soluciones stock se prepararon nuevas, se evaluó nuevamente la precisión y exactitud, límite inferior de cuantificación (LIC). Se calculó concentración real, CV y % ER.

### Estabilidad a largo plazo

Se prepararon 2 soluciones stock de 20 mg de SDZ en un volumen de 10 mL de NaOH 0.025 N. Se colocaron dentro del refrigerador a una temperatura de 4 °C con aluminio durante 1 semana y 4 meses. Posteriormente se analizaron en el cromatógrafo. Se calculó concentración real, CV y % ER.

### Carga Total de SDZ

Se inyectaron muestras de Bio-MOF cargadas previamente con sulfadiazina diluidas en NaOH a 0.025 y 0.5 M como se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Muestras de BIO-MOF inyectadas**

Muestra	Inyecciones
Mof 1 (Al) 0.025 y 0.5 M	5
Mof 2 (Al/Zn)	5
Mof 3 (Al/Zn/SDZ)	5
ZIF-8 (Zn/SDZ)	5
ZIF-8 (durante la síntesis)	2
ZIF-8 (después de la síntesis)	2

Para el Bio-MOF ZIF-8 (durante y después de la síntesis) se realizaron 2 inyecciones de cada uno, en muestras que eran de días diferentes.

### Desarrollo y validación del método analítico para LNZ

Previo al análisis se lavó y acondicionó el área de trabajo adecuadamente. Para el desarrollo del método se empleó una Micropipeta de 100-1000 µL, así como el estándar de Linezolid (grado USP de 99% de pureza). Se utilizó metanol grado HPLC (CLAR) y Buffer de fosfatos pH 7.4

Para efectuar el análisis se utilizó un cromatógrafo automatizado de líquidos marca Agilent Modelo Infinity 1260, con detector UV con arreglo de diodos y una columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, (4.6 x 150 mm), con tamaño de partícula de 2.7 µm. Empleando como fase móvil agua + ácido acético glacial y acetonitrilo (ACN).

## Linealidad

Se preparó una solución stock pesando 5 mg de Linezolida y se llevó a un volumen de 5 mL en un matraz volumétrico con metanol. A partir de esta solución stock se tomaron diversas alícuotas para construir una curva de calibración con 6 niveles correspondientes a una concentración teórica conocida como se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8. Curva de calibración LNZ**

Punto o Nivel	[ µg/mL]	Alícuota (µL)	Aforo (mL)
1	5	125	25
2	10	100	10
3	25	125	5
4	50	250	5
5	75	375	5
6	100	500	5

Posteriormente se agitó suavemente cada matraz volumétrico y se filtró 1 mL de cada una de las muestras en viales para CLAR con un filtro de membrana de 0.45 µm y una jeringa. Además, se filtró 1 mL de metanol en un vial que se utilizó como blanco para el análisis. Así mismo se preparó un vial de adecuabilidad para verificar la funcionalidad del equipo. La preparación de la curva de calibración se realizó por triplicado.

Previo al análisis también se realizó la preparación de la fase orgánica (Acetonitrilo) y fase acuosa (Agua + Ácido acético glacial) como se indica en la tabla 9.

**Tabla 9. Composición de la fase móvil para el método con LNZ**

Fase	Disolventes grado HPLC
Orgánica	Acetonitrilo 400 mL
Acuosa	Agua 692 mL + 8 mL de ácido acético glacial

\*\* Cada fase se filtró a vacío con el equipo de filtración por membrana con tamaño de poro de 0.45 µm.

Las condiciones a las cuales se efectuó el análisis cromatográfico se indican en la tabla 10.

**Tabla 10. Condiciones cromatográficas de análisis para LNZ**

Flujo	Volumen de inyección	Temperatura	Longitud de onda	Fase móvil	Fase estacionaria
1 mL/min	5 µL	25° C	254 nm	75% fase acuosa 25% fase orgánica	Columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, (4.6 x 150 mm), tamaño de partícula de 2.7 µm.

Con los datos obtenidos se realizó el gráfico de cada una de las curvas de calibración y se calculó el coeficiente de variación (CV), la concentración real, y % Error Relativo (% ER).

#### **Límite inferior de cuantificación (LIC)**

Se preparó una solución stock pesando 5 mg de Linezolida y se llevó a un volumen de 5 mL en un matraz volumétrico con metanol. Se tomó una alícuota de 125 µL y se colocó en un matraz de 25 mL llevando al aforo con metanol. Se tomó 1 mL y se filtró con membrana de 0.45 µm y una jeringa en un vial. Se realizaron 5 inyecciones y se calculó concentración real, CV y % ER.

#### **Precisión y Exactitud**

Se preparó una solución stock pesando 5 mg de Linezolida y se llevó a un volumen de 5 mL en un matraz volumétrico con metanol. Se tomaron alícuotas de 200, 175 y 425 µL correspondientes a concentraciones baja, media y alta (8, 35 y 85 µg/mL) y se colocaron de manera independiente en matraces de 25, 5 y 5 mL respectivamente, llevando al aforo con metanol. Se tomó 1 mL de cada matraz y se filtró con membrana y una jeringa en un vial. Se realizaron 5 inyecciones y se calculó concentración real, CV y % ER.

### Selectividad

La selectividad para LNZ se evaluó con metanol en presencia de las estructuras Bio-MOF-53 (Al), Bio-MOF 53 (Al/Zn) y el Bio-MOF-ZIF 8 (Zn) así como; de los materiales que se emplean para la síntesis de las estructuras vacías de acuerdo con la tabla 11.

**Tabla 11. Materias primas empleadas en selectividad para LNZ**

Vial	Materia Prima	Cantidad (mg)	Metanol (mL)	Concentración mg/mL
1	BDC	2	25	0.08
2	Al <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>			
3	Zn(O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>			
4	ZIF-8 Rs			
5	Zn (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>			
6	MIL-53 Al/Zn			
7	MIL-53 Al			
8	MOF 1			
9	MOF2			

### Repetibilidad

La repetibilidad se evaluó en 2 días diferentes realizando la preparación de fases y soluciones stock nuevas para la curva de calibración, se evaluó nuevamente la precisión y exactitud como se mencionó anteriormente. Posterior a ello se realizó el tratamiento de los datos calculando concentración real, CV y % ER.

### Reproducibilidad

La reproducibilidad se evaluó en 2 días diferentes por otro analista realizando toda la validación del método desde cero. La preparación de fases y soluciones stock nuevas, se evaluó nuevamente la precisión y exactitud, límite inferior de cuantificación (LIC). Se calculó concentración real, CV y % ER.

### Estabilidad a largo plazo

Se preparó una solución stock de 5 mg de LNZ en un volumen de 5 mL de metanol. Se colocó dentro del refrigerador a una temperatura de 4 °C con aluminio durante 17 días y posteriormente se analizaron en el cromatógrafo. Se calculó concentración real, CV y % ER.



## RESULTADOS

### Resultados para Sulfadiazina (SDZ)

- Desarrollo del método analítico CLAR

Las condiciones evaluadas y seleccionadas se reportan en la tabla 12.

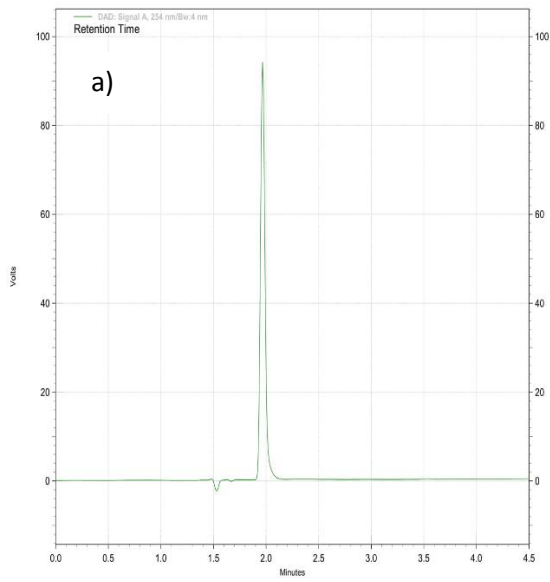
**Tabla 12. Condiciones empleadas durante el desarrollo del método por CLAR para SDZ**

	Condiciones evaluadas	Seleccionada
<b>Fase estacionaria</b>	Columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, (4.6 x 150 mm), tamaño de partícula de 2.7 µm. Columna C <sub>18</sub> (4.6 x 50 mm) tamaño de partícula de 2.7 µm.	Columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, (4.6 x 150 mm), tamaño de partícula de 2.7 µm.
<b>Fase móvil</b>	Porción (Acuosa-Orgánica) 60-40, 70-30, 80-20 y 88-12 %	88-12 %
<b>Medio de disolución</b>	NaOH 1 N, 0.5 N y 0.025 N, buffer de fosfatos pH 7.4	NaOH 0.025 N y Buffer de fosfatos pH 7.4
<b>Flujo</b>	0.5, 0.8, 1.0 y 1.2 mL/min	1.2 mL/min
<b>Longitud de onda</b>	254 nm y 264 nm	254 nm
<b>Temperatura</b>	25 y 30°C	25°C
<b>Volumen de inyección</b>	5 y 10 µL	5 µL

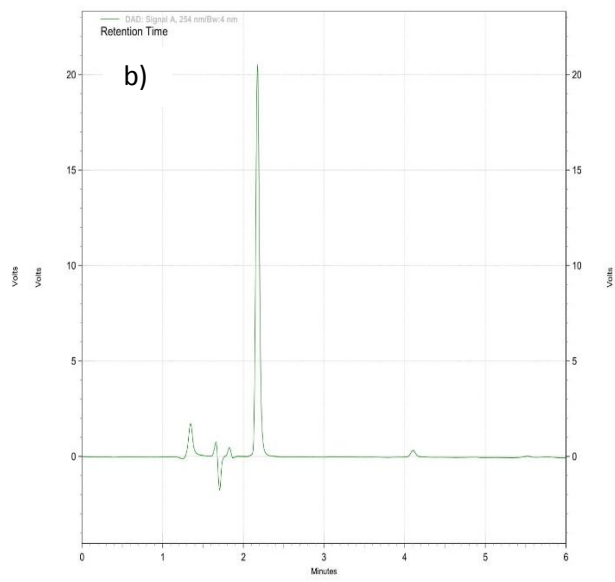
- Validación del método analítico para SDZ

A partir de las condiciones seleccionadas, en la figura 6 se muestran los cromatogramas con los tiempos de retención de la sulfadiazina y de los blancos empleados como: NaOH 0.025 N y Buffer de fosfatos pH 7.4

BLANCO NaOH



BLANCO BUFFER



SDZ

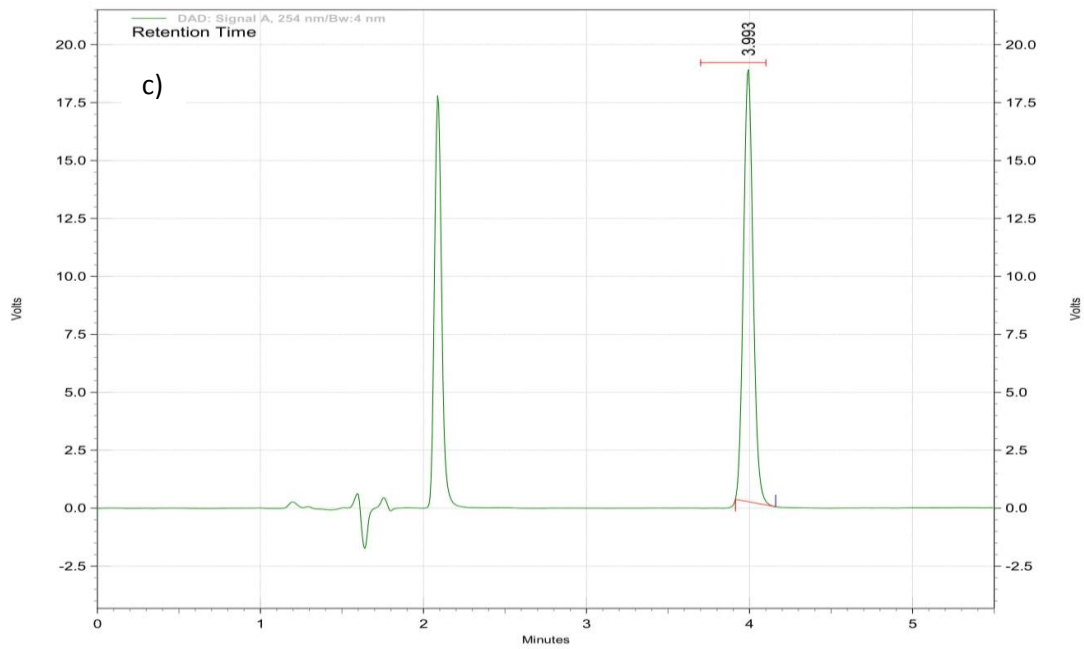


Figura 6. Cromatogramas obtenidos con el método CLAR para sulfadiazina: a) Blanco NaOH 0.025 N, b) Blanco Buffer fosfatos pH 7.4 y c) Tiempo de retención sulfadiazina (SDZ)

## Linealidad

En la figura 7 se muestran las tres réplicas de las curvas de calibración que se realizaron con su respectivo coeficiente de correlación, pendiente y su intercepto para poder interpolar las muestras control y problema. Además, se muestra una curva promedio que contiene un CV de 1.09 y un % ER de 0.82; mostrados en la tabla 13.

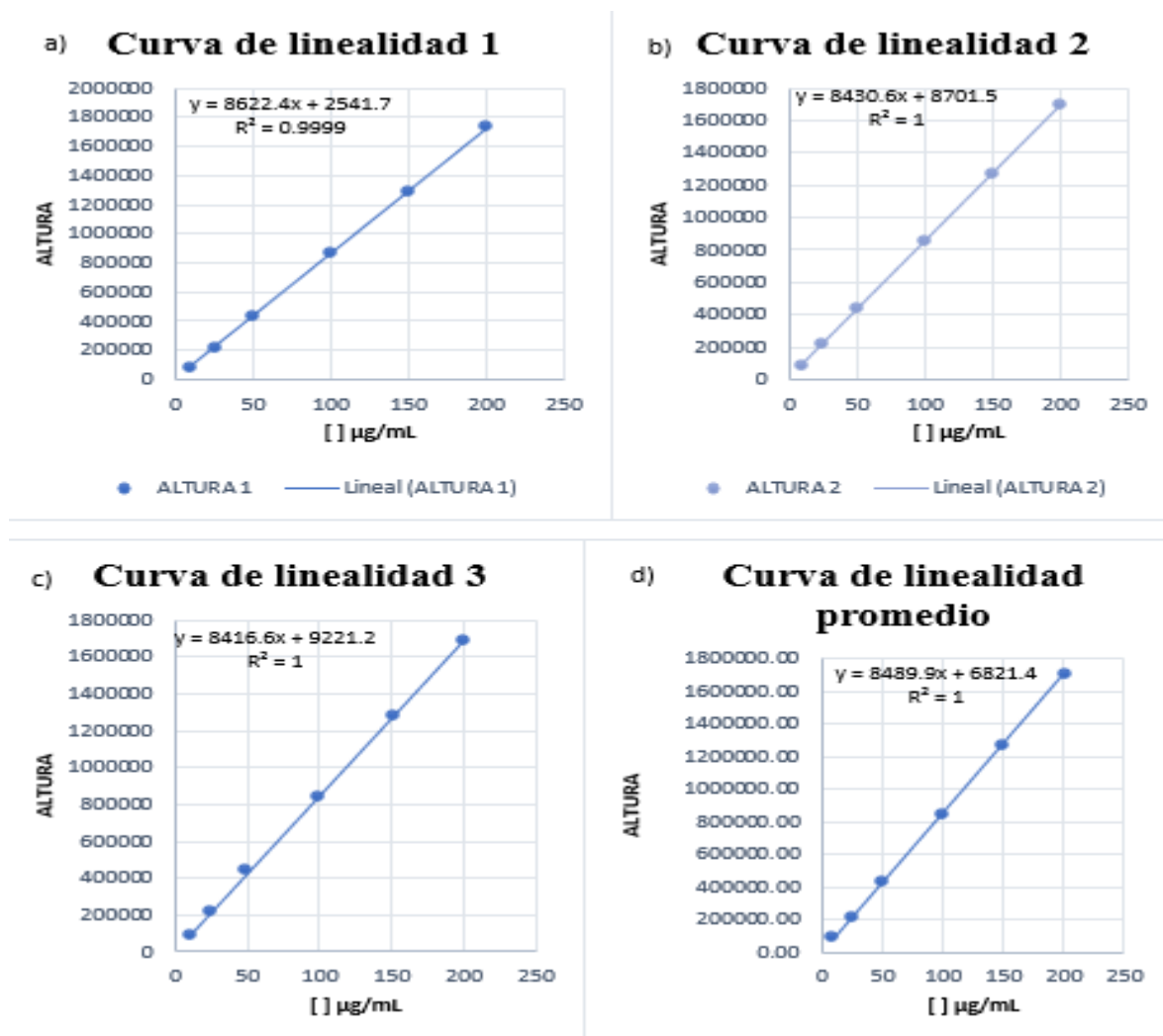


Figura 7. Gráficos obtenidos en la determinación de la linealidad del sistema con NaOH 0.025 N por CLAR para SDZ: a) Curva de calibración replica 1, b) Curva de calibración replica 2, c) Curva de calibración replica 3 y d) Curva de calibración promedio y referencia de SDZ. En todas se graficó altura vs [ µg/mL].

**Tabla 13. Resultados de Linealidad con NaOH (CV y % ER)**

Punto o nivel	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
1	10	9.72	2.26	-2.84
2	25	24.99	0.92	-0.04
3	50	50.68	0.63	1.37
4	100	99.74	0.64	-0.26
5	150	149.59	0.64	-0.27
6	200	200.28	1.49	0.14
Promedio			1.09	0.82

En la figura 8 se muestran las tres réplicas de las curvas de calibración con buffer de fosfatos a pH=7 que se realizaron con su respectivo coeficiente de correlación, pendiente y su intercepto para poder interpolar las muestras control y problema. Además, se muestra una curva promedio que contiene un CV de 0.14 y un % ER de -23.18 mostrados en la tabla 14.

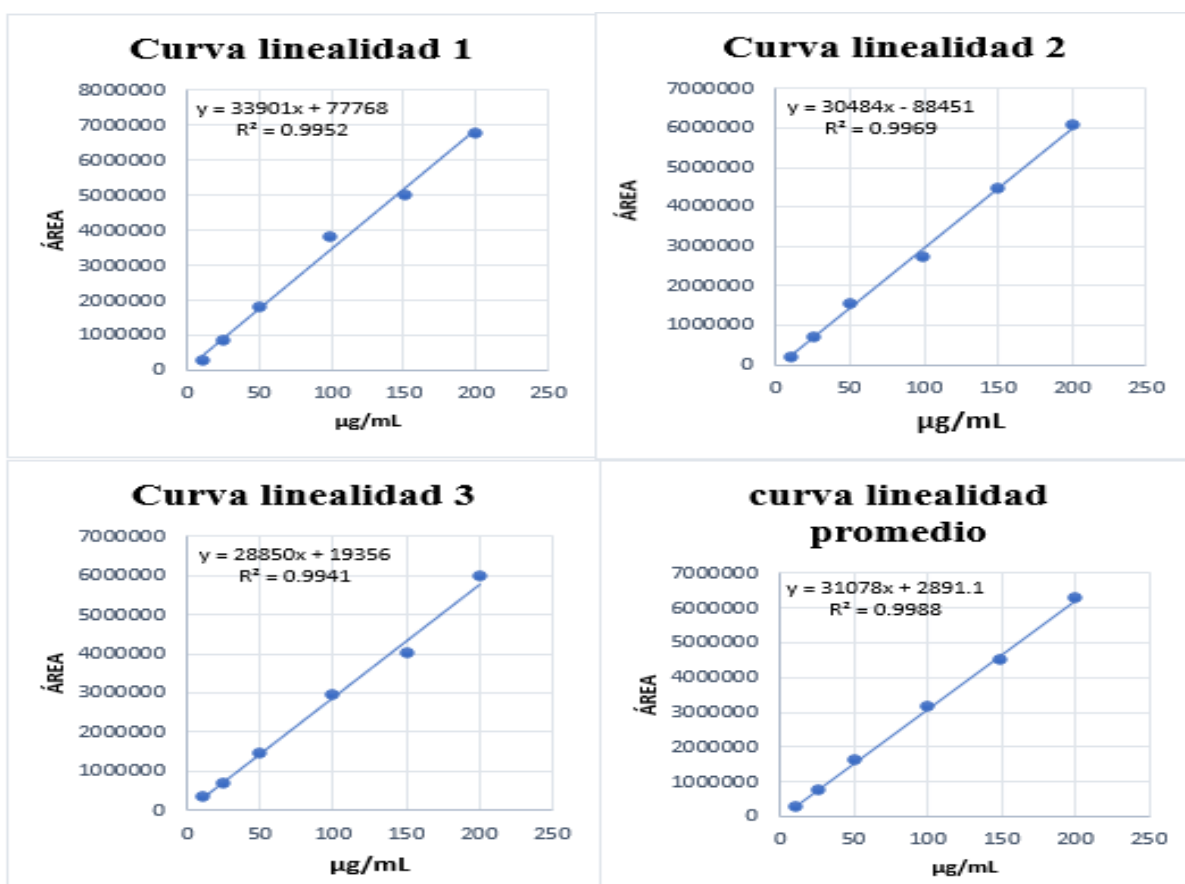


Figura 8. Gráficos obtenidos en la determinación de la linealidad del sistema con Buffer de fosfatos pH 7.4 por CLAR para SDZ: a) Curva de calibración replica 1, b) Curva de calibración replica 2, c) Curva de calibración replica 3 y d) Curva de calibración promedio y referencia de SDZ. En todas se graficó área vs [µg/mL].

**Tabla 14. Resultados de Linealidad con buffer (CV y % ER)**

Punto o nivel	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Coficiente de Variación (CV)
1	10	6.72	0.284
2	25	18.89	0.085
3	50	40.47	0.110
4	100	80.53	0.181
5	150	114.58	0.112
6	200	160.55	0.068
Promedio			0.14

### Límite Inferior de Cuantificación (LIC)

En la figura 9 se observa una curva que relaciona el área de respuesta del pico cromatográfico del activo en función de la concentración utilizada en la cual se interpolaron 5 repeticiones a concentración de 5 y 10 µg/mL. En la tabla 15 se observa el CV igual a 4.92 para 5 y 1.49 para 10 µg/mL y el % de ER igual a 61.66 para 5 y 0.75 para 10 µg/mL

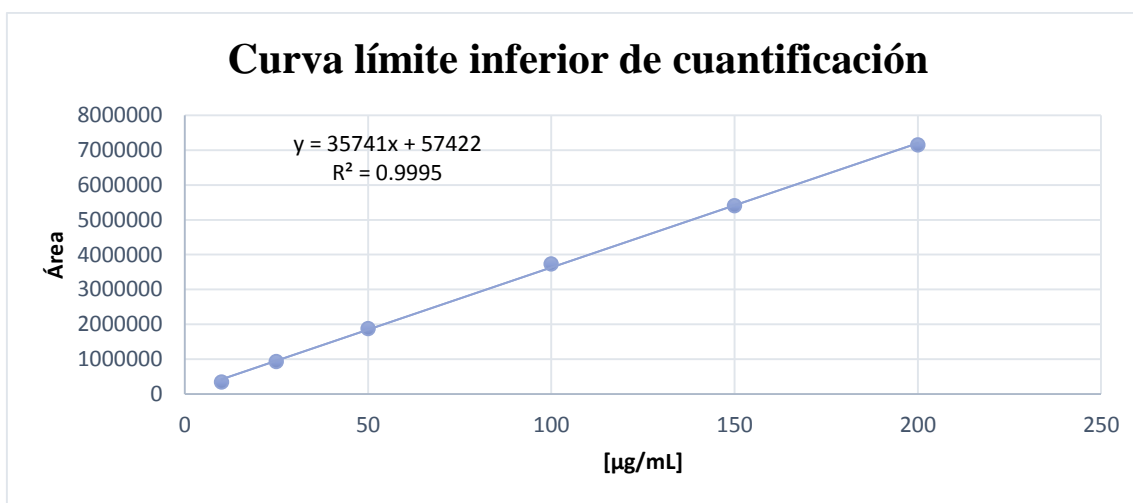


Figura 9. Curva de LIC para SDZ por CLAR, se graficó área vs [µg/mL].

**Tabla 15. Resultados LIC (CV y % ER)**

Muestra	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Promedio de las 5 inyecciones	Coficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
1	5	3.83	39375.2	4.92	-61.66
2	10	10.07	92354.2	1.49	0.75

### Precisión y Exactitud

En la figura 10 se observa una curva de calibración en la cual se interpolaron 5 repeticiones a concentración de 50, 78 y 155  $\mu\text{g/mL}$ . En la tabla 16 se observa el CV igual a 0.16, 0.10 y 0.05 para las concentraciones anteriormente mencionadas, así como, el % ER igual a 1.72, 0.449 y 0.077.

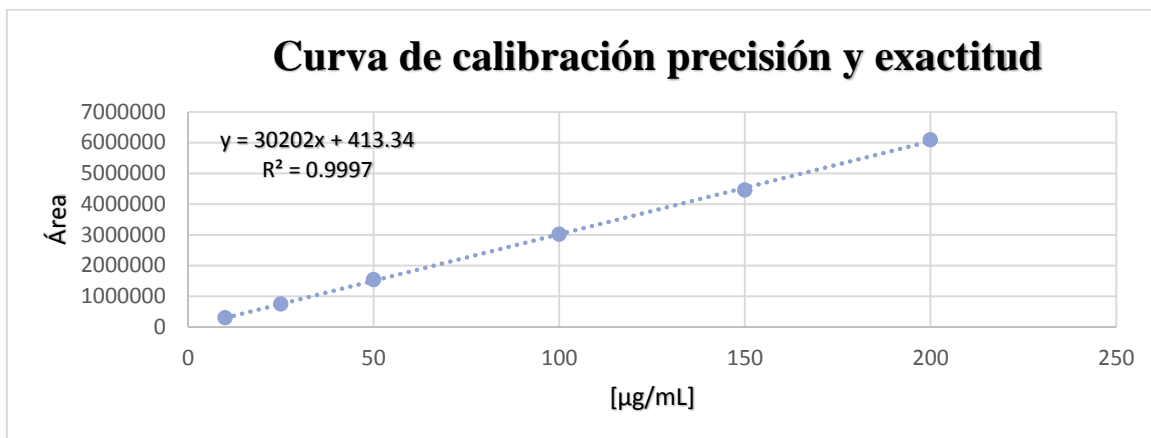


Figura 10. Curva de Precisión y Exactitud para SDZ por CLAR, se graficó área vs [ $\mu\text{g/mL}$ ].

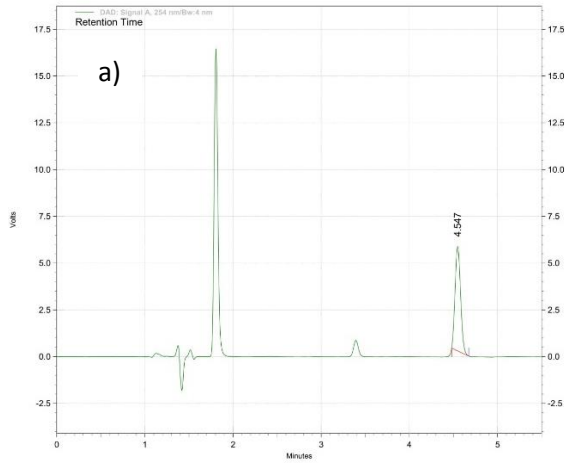
Tabla 16. Resultados Precisión y Exactitud (CV y % ER)

Muestra Control	Teórica [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Real [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	50	50.86	1536337	0.16	-1.72
Media	78	77.65	2345631.8	0.10	0.449
Alta	155	154.88	4678123.4	0.05	0.077

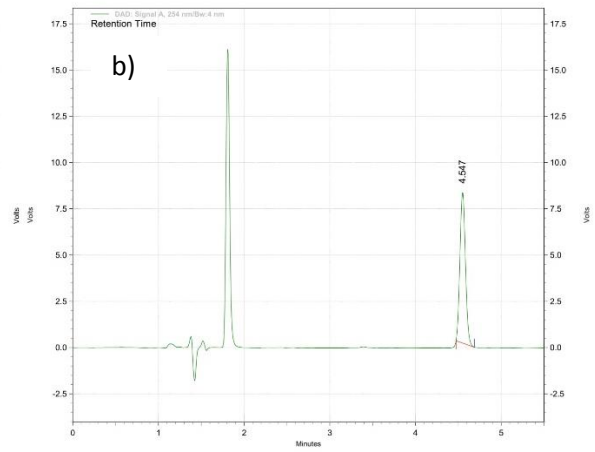
### Selectividad

En la figura 11 y 12 se muestran los cromatogramas obtenidos de las materias primas que se ocupan para la síntesis de los Bio-MOF, así como los Bio-MOF-53 y ZIF-8 (estructura vacía). Evaluados con NaOH 0.025 N y buffer fosfatos pH 7.4

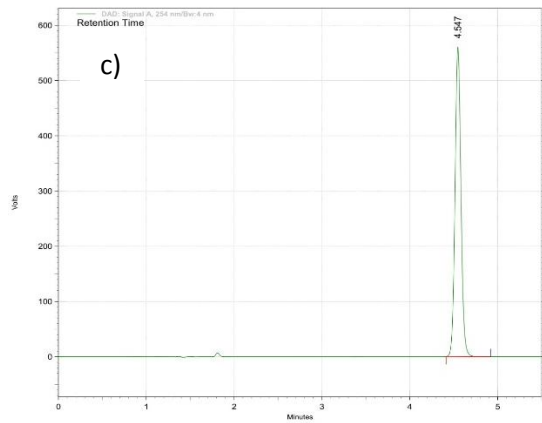
2-MIM NaOH



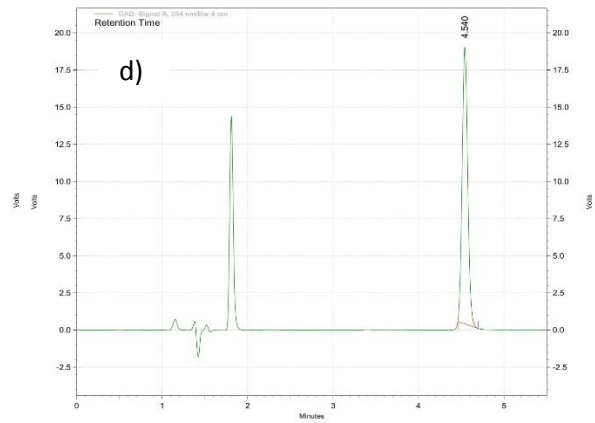
ACETATO DE ZINC- NaOH



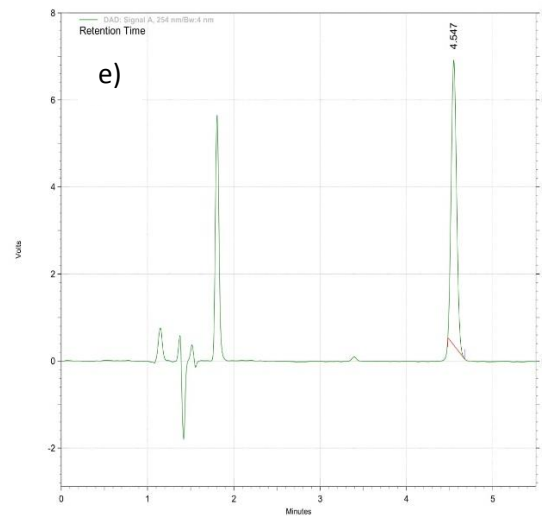
BDC- NaOH



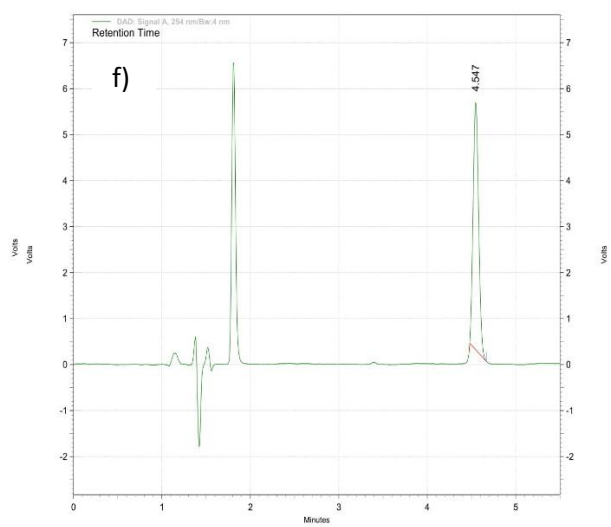
NITRATO DE ALUMINIO- NaOH



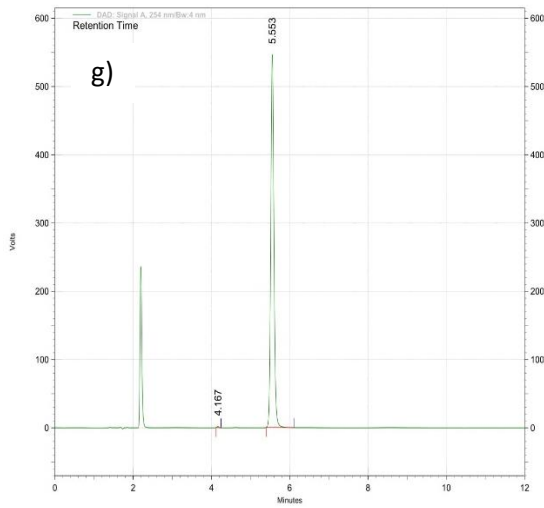
NITRATO DE ZINC- NaOH



ZIF-8 NaOH



BIO-MOF 1



BIO-MOF 2

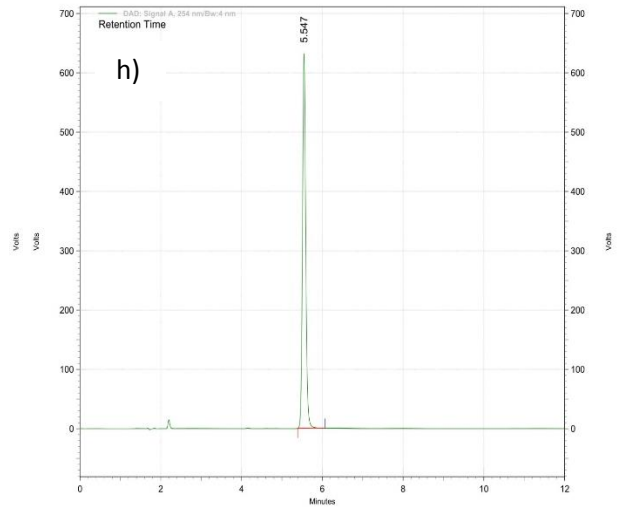
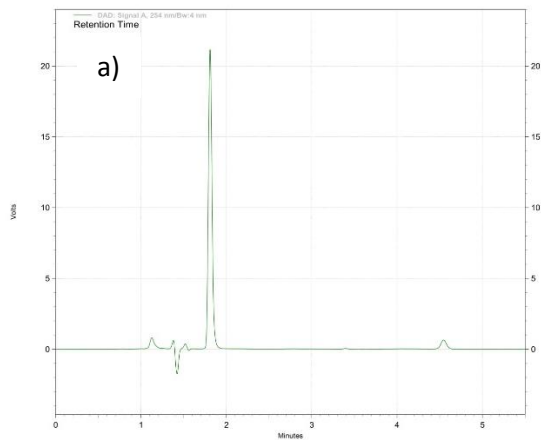
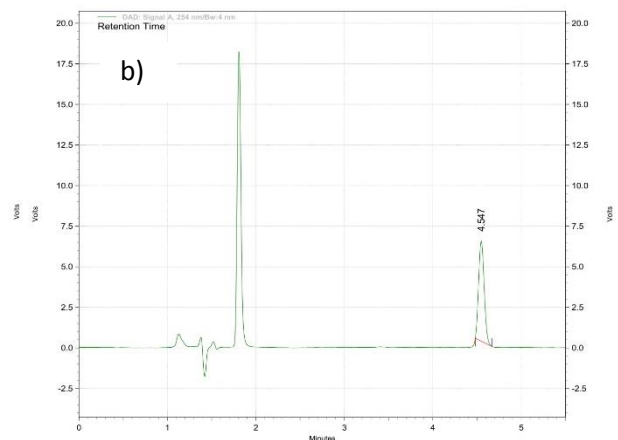


Figura 11. Cromatogramas obtenidos con el método CLAR para sulfadiazina de las materias primas: a) 2-MIM, b) acetato de zinc, c) BDC, d) nitrato de aluminio, e) nitrato de zinc, f) ZIF-8, g) MOF-53 Al y h) MOF-53 Al/Zn con NaOH 0.025 N

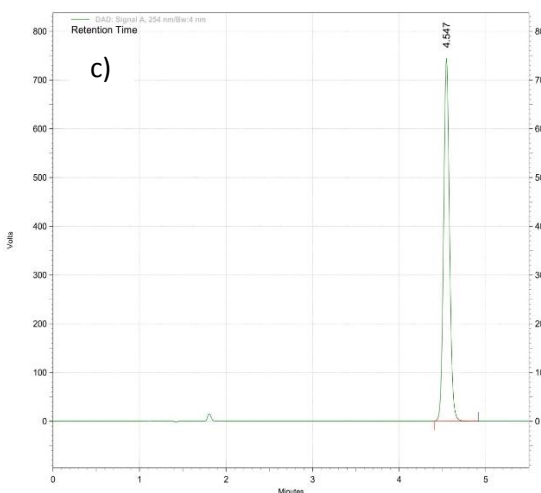
2-MIM



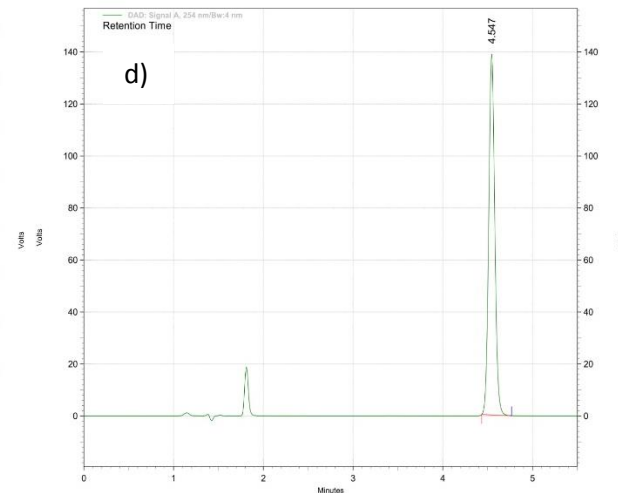
ACETATO DE ZINC



BDC

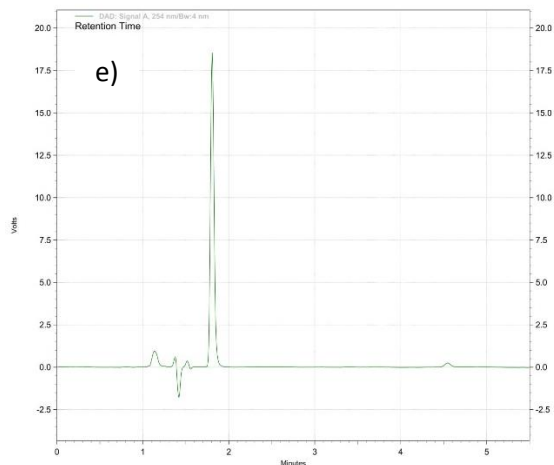


Nitrato de Aluminio

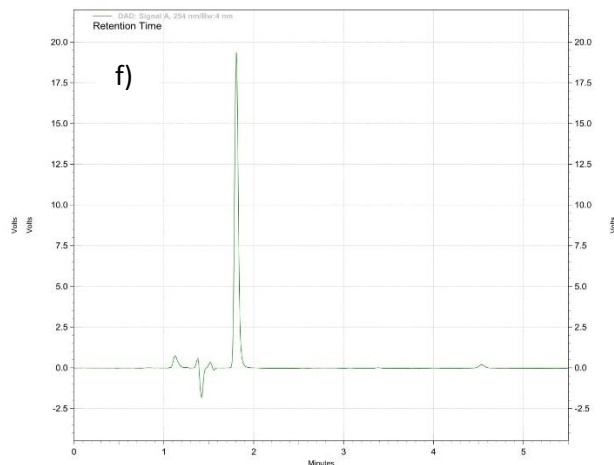




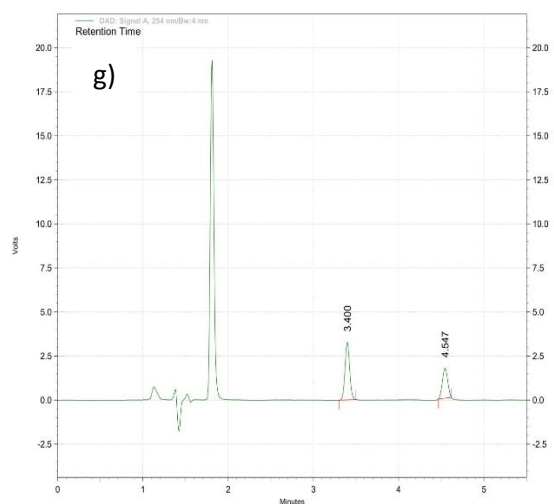
Nitrato de zinc



ZIF-8



POOL



PIEL DE CERDO

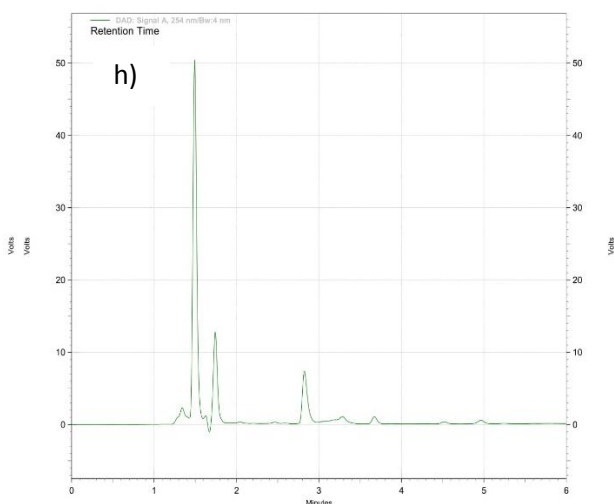


Figura 12. Cromatogramas obtenidos con el método CLAR para sulfadiazina de las materias primas: a) 2-MIM, b) acetato de zinc, c) BDC, d) nitrato de aluminio, e) nitrato de zinc, f) ZIF-8, g) pool y h) piel de cerdo con buffer de fosfatos pH 7.4

### Repetibilidad

En la figura 13 se observa una curva de calibración en la cual se interpolaron 5 repeticiones a concentración de 50, 78 y 155  $\mu\text{g/mL}$ . En la tabla 17 se observa el CV igual a 0.43, 0.47 y 0.40 para las concentraciones anteriormente mencionadas, así como, el % ER igual a 1.94, 0.705 y 0.665.

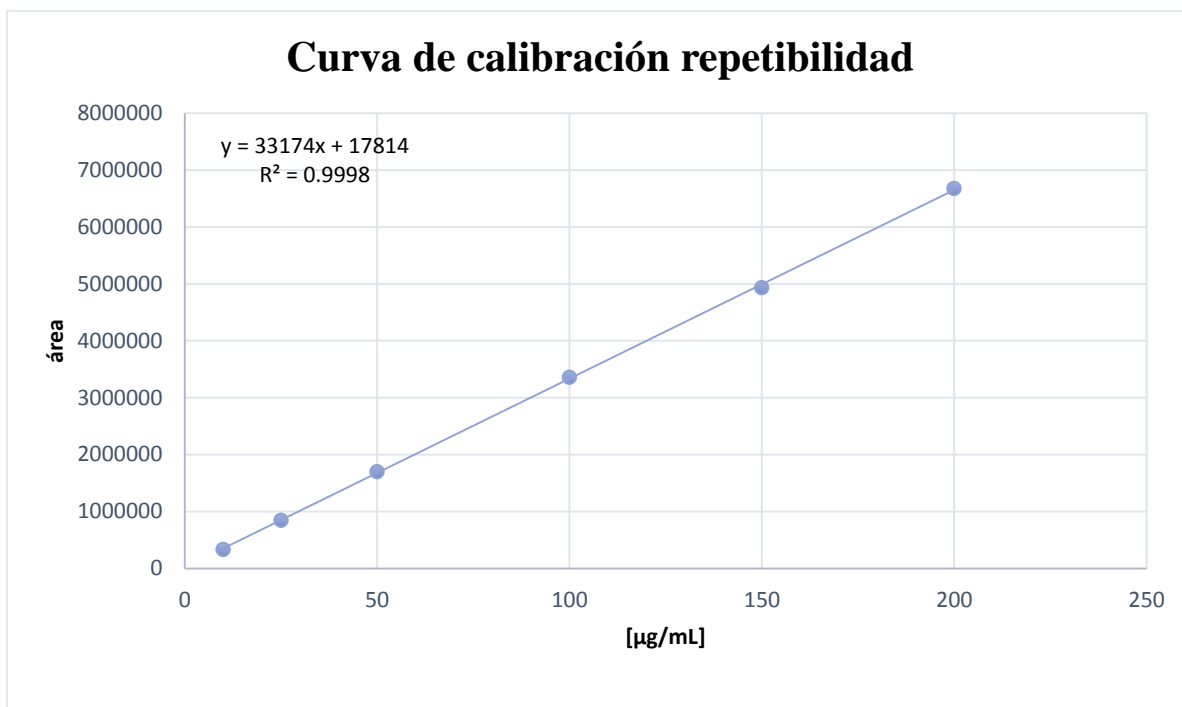


Figura 13. Curva de repetibilidad para SDZ por CLAR, se graficó el área vs [µg/mL].

Tabla 17. Resultados Repetibilidad (CV y % ER)

Muestra Control	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	50	50.97	388523.8	0.43	-1.94
Media	78	77.45	58888.2	0.47	0.705
Alta	155	153.97	1167888	0.40	0.665

### Reproducibilidad

En la figura 14 se observa una curva de calibración en la cual se interpolaron 5 repeticiones a concentración de 50, 78 y 155 µg/mL. En la tabla 18 se observa el CV igual a 0.43, 0.08 y 0.05 para las concentraciones anteriormente mencionadas, así como, el % ER igual a 1.1, 0.449 y 0.071.

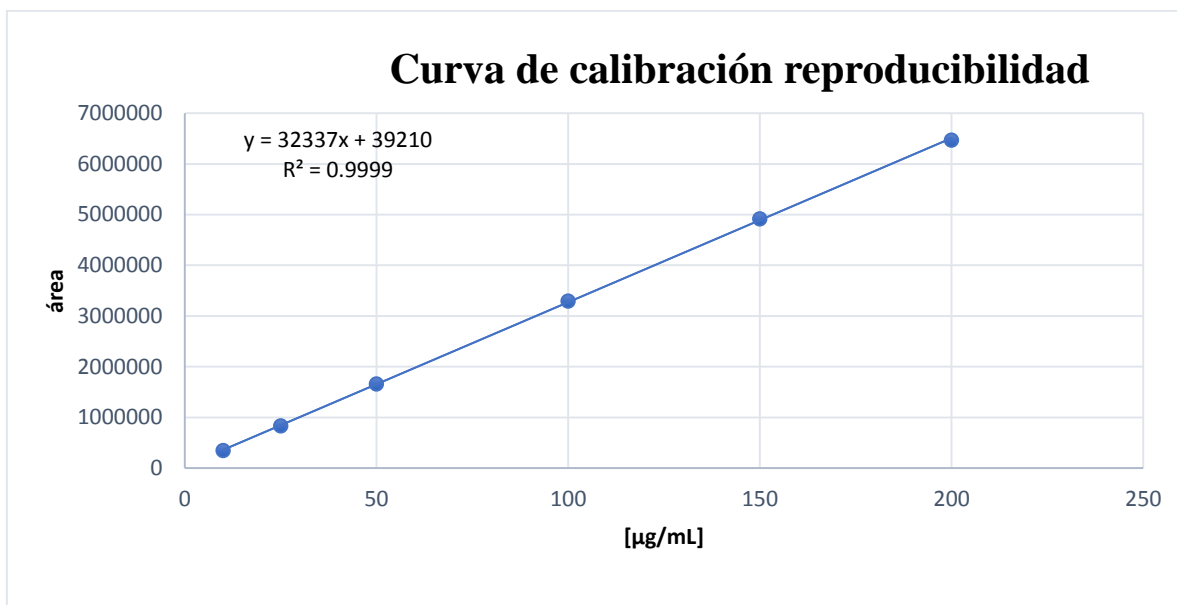


Figura 14. Curva de Reproducibilidad para SDZ por CLAR, se graficó el área vs [µg/mL]

**Tabla 18. Resultados Reproducibilidad (CV y % ER)**

Muestra Control	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	50	50.55	1527137	0.43	-1.1
Media	78	77.65	2345571.8	0.08	0.449
Alta	155	154.89	4678343.4	0.05	0.071

### Estabilidad a largo plazo

En la figura 15 se observa una curva de calibración de estabilidad de una solución stock que se mantuvo en el refrigerador por 4 meses a 4°C, tapada con aluminio y una solución stock que se mantuvo 1 semana en el refrigerador a las mismas condiciones. Donde se interpolaron 5 repeticiones a concentración de 64, 128 y 240 µg/mL. En la tabla 19, 20 y 21 se observa el CV y el %ER para los tiempos y concentraciones anteriormente mencionadas.

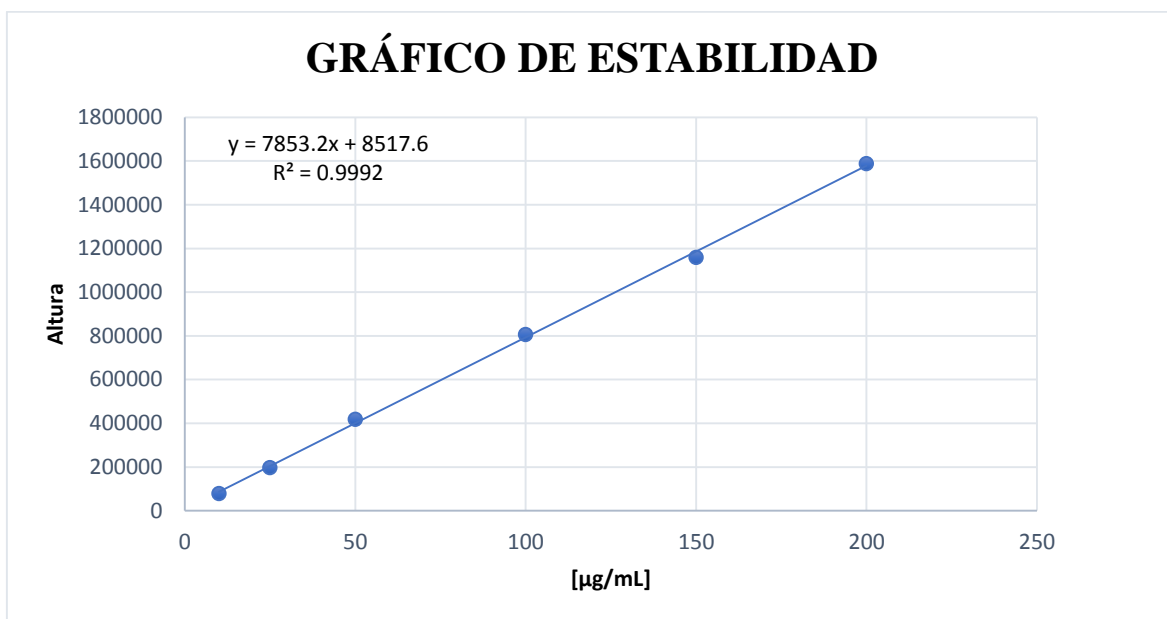


Figura 15. Curva de Estabilidad para SDZ por CLAR, se graficó altura vs [ $\mu\text{g/mL}$ ].

**Tabla 19. Resultados de Estabilidad del día**

Muestra Control	Teórica [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Real [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	64	64.14	2214575.4	0.06	0.22
Media	128	128.39	4271448.8	0.13	0.30
Alta	240	240.64	7865111.8	0.06	0.26

**Tabla 20. Resultados de Estabilidad 1 semana**

Muestra Control	Teórica [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Real [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	64	64.04	2211270.8	0.18	-0.063
Media	128	137.92	4576484.6	0.60	-7.750
Alta	240	256.10	8359977.6	3.41	-6.708

**Tabla 21. Resultados de Estabilidad 4 meses**

Muestra Control	Teórica [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Real [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	75	75.51	2756309.2	0.45	-0.68
Media	140	140.7	5086330.8	0.19	-0.5
Alta	298	298.61	10729966.6	0.04	-0.201

### Carga Total SDZ

En la figura 16 se observa la curva de calibración donde se interpolaron las 5 repeticiones de cada una de las muestras de Bio-MOF que aparecen en la tabla 22. Se observa el CV y la concentración real de SDZ cargada.

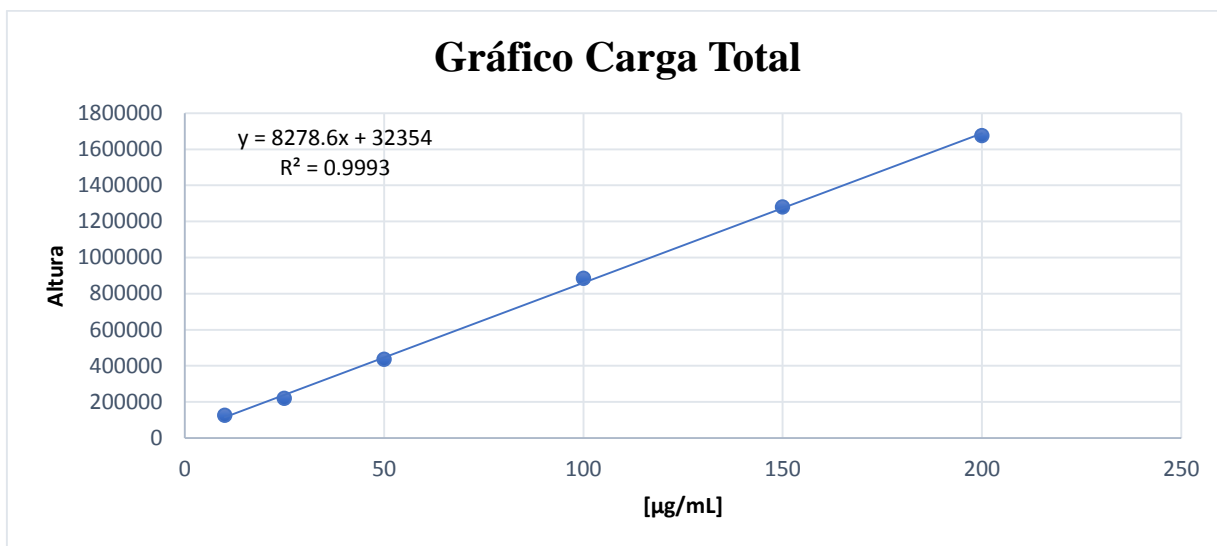


Figura 16. Curva de Carga total para SDZ por CLAR, se graficó altura vs [µg/mL].

Tabla 22. Resultados carga total de SDZ

Muestra	[ ] M de hidróxido de sodio	[ ] Real µg/mL	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	de
Bio-MOF 1 (Al)	0.025	252.64	8596492	3.59	
Bio-MOF 1 (Al)	0.025	118.02	4088660.6	2.88	
Bio-MOF 2 (Al + Zn)	0.025	270.70	9201338.6	19.02	
Bio-MOF 3 (Al + Zn + SDZ)	0.025	1.73	194154	148.87	
ZIF-8 día 1 (durante la síntesis)	0.025	1.39	---	---	
ZIF-8 día 2 (durante la síntesis)	0.025	-0.74	---	---	
ZIF-8 día 1 (después de la síntesis)	0.025	34.73	---	---	
ZIF-8 día 1 (después de la síntesis)	0.025	34.46	---	---	

## Resultados de Linezolid (LNZ)

- Desarrollo del método analítico CLAR

Se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos científicos donde se reportó la validación de métodos analíticos cromatográficos (CLAR) para la linezolid. Las condiciones del análisis y las referencias bibliográficas de los artículos consultados se muestran en la tabla 23.

**Tabla 23. Condiciones de análisis reportadas para LNZ**

Analito cuantificado	Condiciones del Análisis				Referencia bibliográfica
	Fase estacionaria	Fase móvil	Flujo y detección UV	Tiempo de corrida	
<b>LNZ</b>	Columna X Bridge C18 (4.6 x 150 mm) tamaño de partícula 3.5 µm. temperatura 35°C	Ácido Fosfórico 0.05% / ACN (75/25 % v/v)	1 mL/min 254 nm	12 minutos LNZ 4-10.6 minutos	(Cattaneo et al., 2010)
<b>LNZ</b>	Columna Nucleosil-100 5C18 (4x125mm) tamaño de partícula 5 µm. Temperatura 25°C	ACN/Buffer acetato sodio pH 3.7/agua (180:100:720 v/v)	1.3 mL/min 250 nm	10 minutos LNZ 6.6 minutos	(Borner et al., 2001)
<b>LNZ</b>	Columna Zorbax Eclipse XDB C8 (3x100 mm) tamaño de partícula 3 µm	Agua c/n 0.4% trietanolamina ajustar a pH 4 con ácido fosfórico / ACN (90%-10%) (70%-30%)	0.4 mL/min 254 nm	15 minutos 8 min. (90%-10%) 14 min. (70%-30%) LNZ 9.10 minutos	(Toutain et al., 2004)
<b>LNZ</b>	Columna Apollo C18 (4.6 x 150 mm) tamaño de partícula 5 µm	Metanol / Buffer fosfatos pH 7 (40%-60%)	1 mL/min 253 nm	LNZ 7 minutos	(Taylor et al., 2017)
<b>LNZ</b>	Columna PhenoSphere-NEXT C18 (4.6 x 150 mm) tamaño de partícula 5 µm.	ACN/ ácido acético 2.67 mM (25:75 v/v)	1 mL/min 253 nm	10 minutos LNZ 5.5 minutos	(Boak et al., 2005)
<b>LNZ</b>	Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 X 150 mm) tamaño de partícula 5 µm. Temperatura 25°C	Buffer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3 c/n ácido fosfórico /metanol/ACN (60:20:20 v/v/v)	1 mL/min 258 nm	LNZ 2.9 minutos	(Kawy et al., 2012)

Para el desarrollo del método se tomaron como referencia las condiciones de análisis reportadas por (Boak et al., 2005).

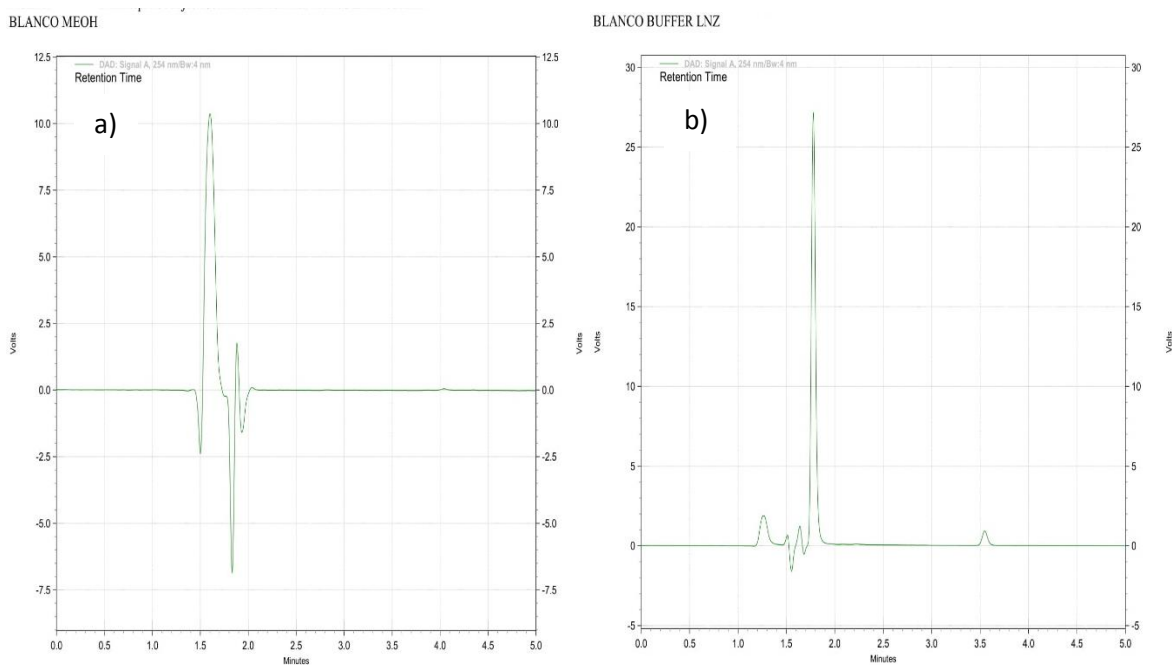
Las condiciones evaluadas y seleccionadas se muestran en la tabla 24.

**Tabla 24. Condiciones empleadas durante el desarrollo del método por CLAR para LNZ**

	Condiciones evaluadas	Seleccionada
<b>Fase estacionaria</b>	Columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, (4.6 x 150 mm), tamaño de partícula de 2.7 µm.	Columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, (4.6 x 150 mm), tamaño de partícula de 2.7 µm.
<b>Fase móvil</b>	Porción (Acuosa-Orgánica) 50-50, 60-40, 65-35, 80-20 y 75-25 %	75-25 %
<b>Medio de disolución</b>	Acetona, NaOH 0.025 N y Metanol	Metanol
<b>Flujo</b>	0.7, 0.8, 0.9, 1.0 y 1.2 mL/min	1 mL/min
<b>Longitud de onda</b>	254 nm y 264 nm	254 nm
<b>Temperatura</b>	25 y 30°C	25°C
<b>Volumen de inyección</b>	5 y 10 µL	5 µL

- Validación del método analítico LNZ

A partir de las condiciones seleccionadas, en la figura 17 se muestran los cromatogramas con los tiempos de retención de la linezolidina y de los blancos empleados como: Metanol y Buffer de fosfatos pH 7.4 donde se observan sus respectivos tiempos de retención.



## LINEZOLIDA

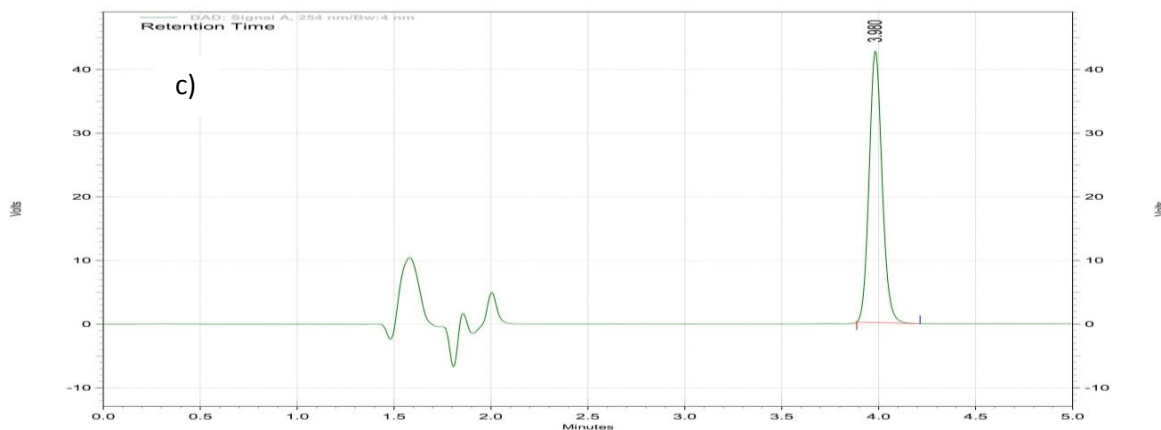


Figura 17. Cromatogramas obtenidos con el método CLAR para linezolid: a) blanco metanol, b) blanco buffer fosfatos, c) tiempo de retención linezolid (LNZ)

### Linealidad

En la figura 18 se muestran las tres réplicas de las curvas de calibración con metanol que se realizaron con su respectivo coeficiente de correlación, pendiente y su intercepto para poder interpolar las muestras control y problema. Además, se muestra una curva promedio que contiene un CV de 0.068 y un % ER de 5.20 mostrados en la tabla 25.

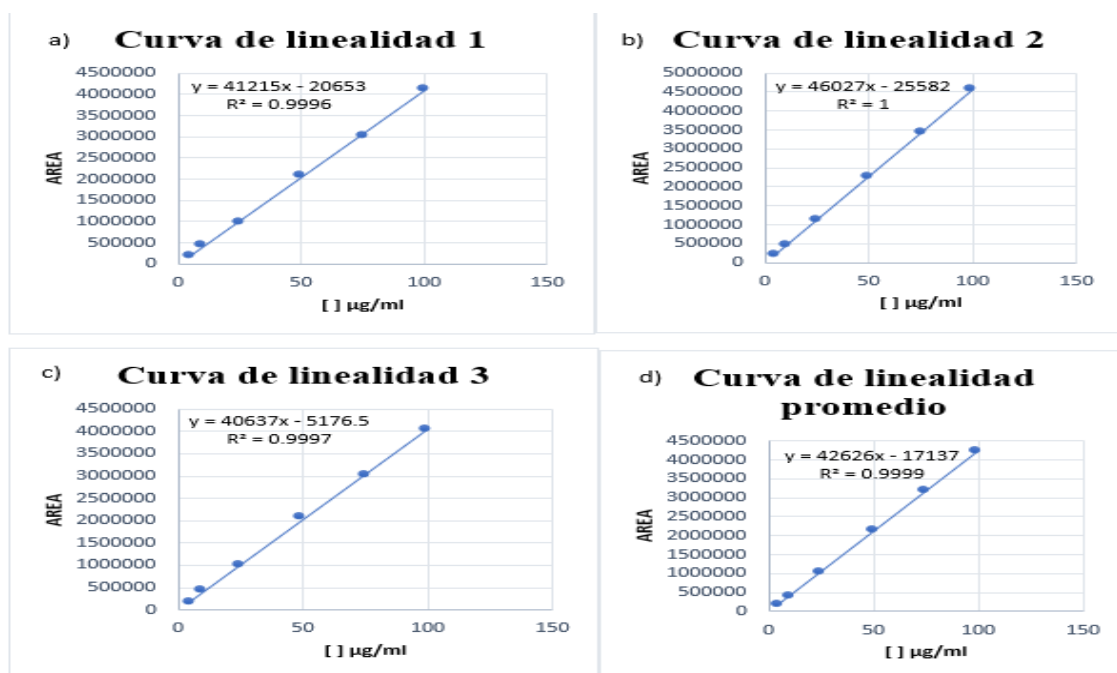


Figura 18. Gráficos obtenidos en la determinación de la linealidad del sistema con metanol por CLAR para LNZ: a) Curva de calibración replica 1, b) Curva de calibración replica 2, c) Curva de calibración replica 3 y d) Curva de calibración promedio y referencia de LNZ. En todas se graficó área vs [µg/mL].



**Tabla 25. Resultados Linealidad con metanol (CV y % ER)**

Punto o nivel	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
1	5	4.02	0.12	-19.51
2	10	9.59	0.02	-4.13
3	25	23.82	0.07	-4.70
4	50	49.70	0.05	-0.60
5	75	73.74	0.08	-1.68
6	100	99.39	0.07	-0.61
Promedio			0.068	5.20

En la figura 19 se muestran las tres réplicas de las curvas de calibración con buffer que se realizaron con su respectivo coeficiente de correlación, pendiente y su intercepto para poder interpolar las muestras control y problema. Además, se muestra una curva promedio que contiene un CV de 0.0355 y un % ER de 16.56 mostrados en la tabla 26.

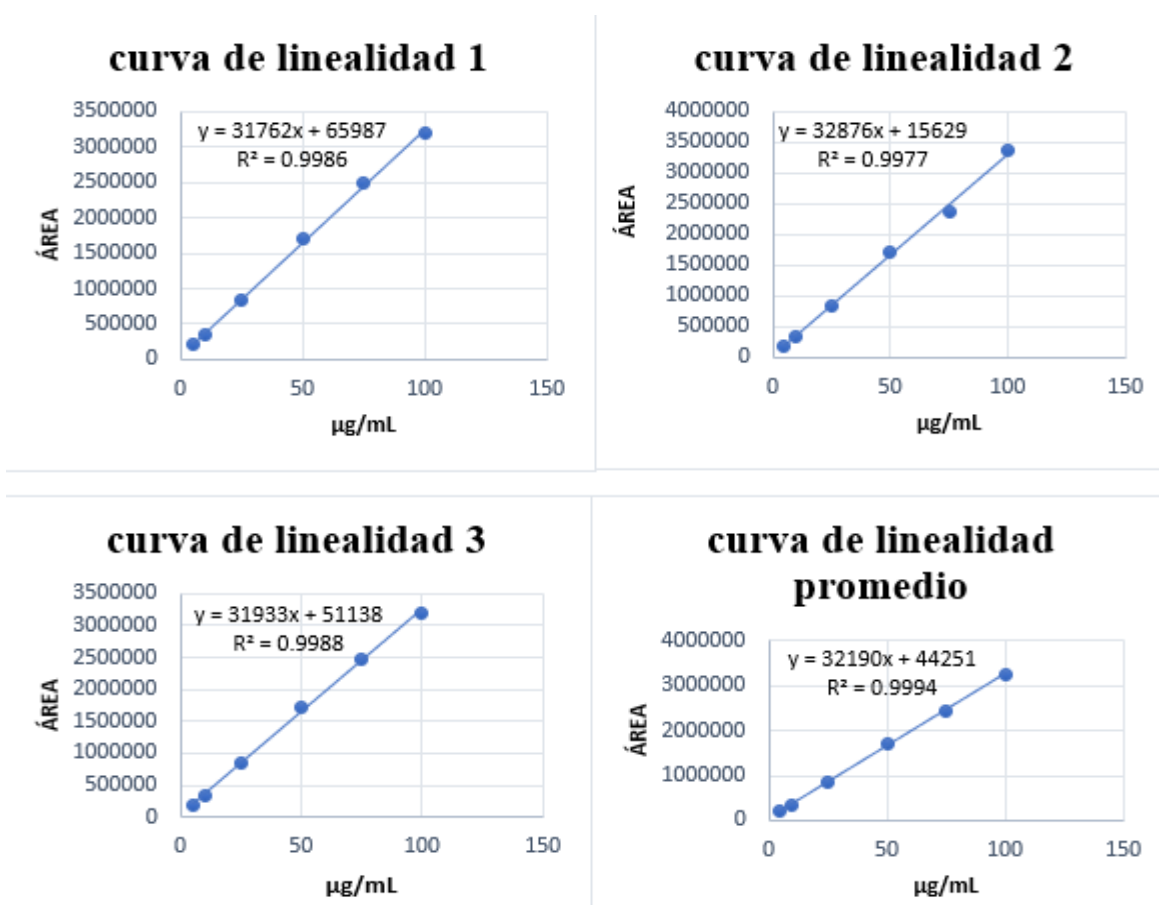


Figura 19. Gráficos obtenidos en la determinación de la linealidad del sistema con Buffer de fosfatos pH 7.4 por CLAR para LNZ: a) Curva de calibración replica 1, b) Curva de calibración replica 2, c) Curva de calibración replica 3 y d) Curva de calibración promedio y referencia de LNZ. En todas se graficó área vs [µg/mL].

**Tabla 26. Resultados Linealidad con Buffer (CV y % ER)**

Punto o nivel	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
1	5	4.20	0.1	-15.98
2	10	8.10	0.049	-19.01
3	25	20.84	0.009	-16.62
4	50	43.32	0	-13.36
5	75	62.29	0.026	-16.95
6	100	82.52	0.029	-17.48
Promedio			0.0355	16.56

### Límite Inferior de Cuantificación

En la figura 20 se observa una curva de calibración en la cual se interpolaron 5 repeticiones a concentración de 5 y 10 µg/mL. En la tabla 27 se observa el CV igual a 1.91 para 5 y 0.46 para 10 µg/mL y el % de ER igual a 28.84 para 5 y 5.17 para 10 µg/mL

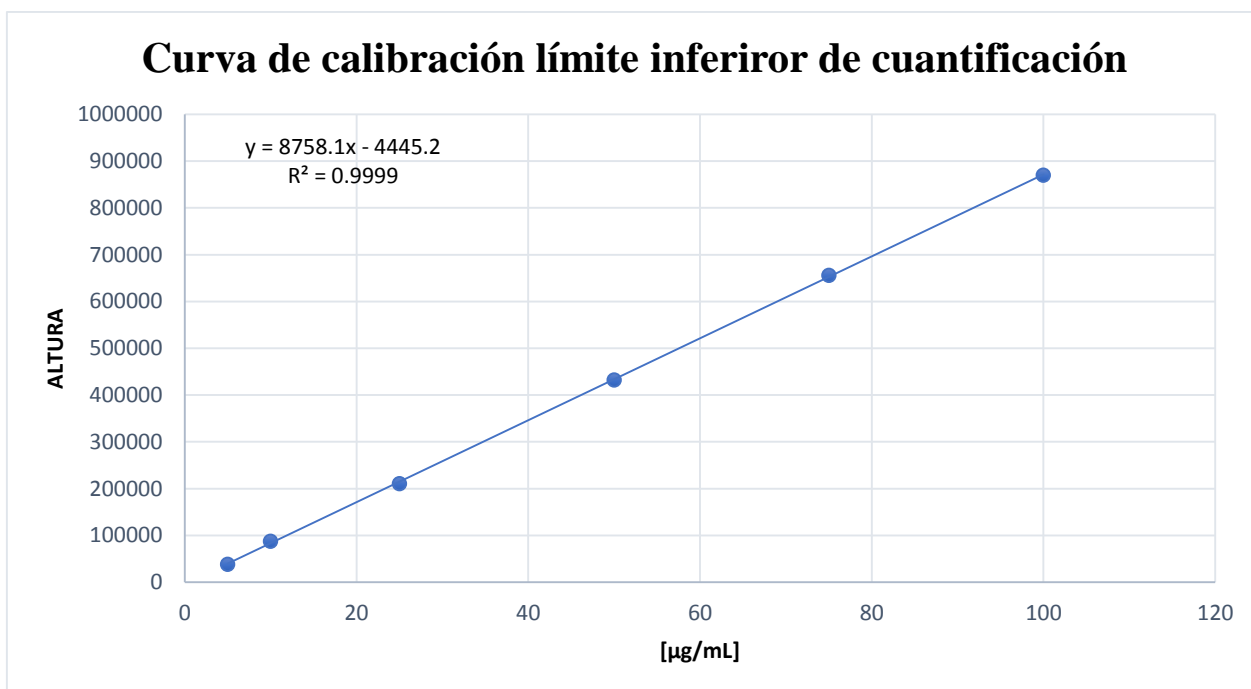


Figura 20. Curva de LIC para LNZ por CLAR, se graficó altura vs [µg/mL].

**Tabla 27. Resultados LIC (CV y % ER)**

Muestra	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
1	5	3.56	36829	1.91	-28.84
2	10	9.48	385527	0.46	-5.17

## Precisión y Exactitud

En la figura 21 se observa una curva de calibración en la cual se interpolaron 5 repeticiones a concentración de 8, 35 y 85  $\mu\text{g/mL}$ . En la tabla 28 se observa el CV igual a 1.12, 0.76 y 1.04 para las concentraciones anteriormente mencionadas, así como, el % ER igual a 10.47, 1.81 y 3.02

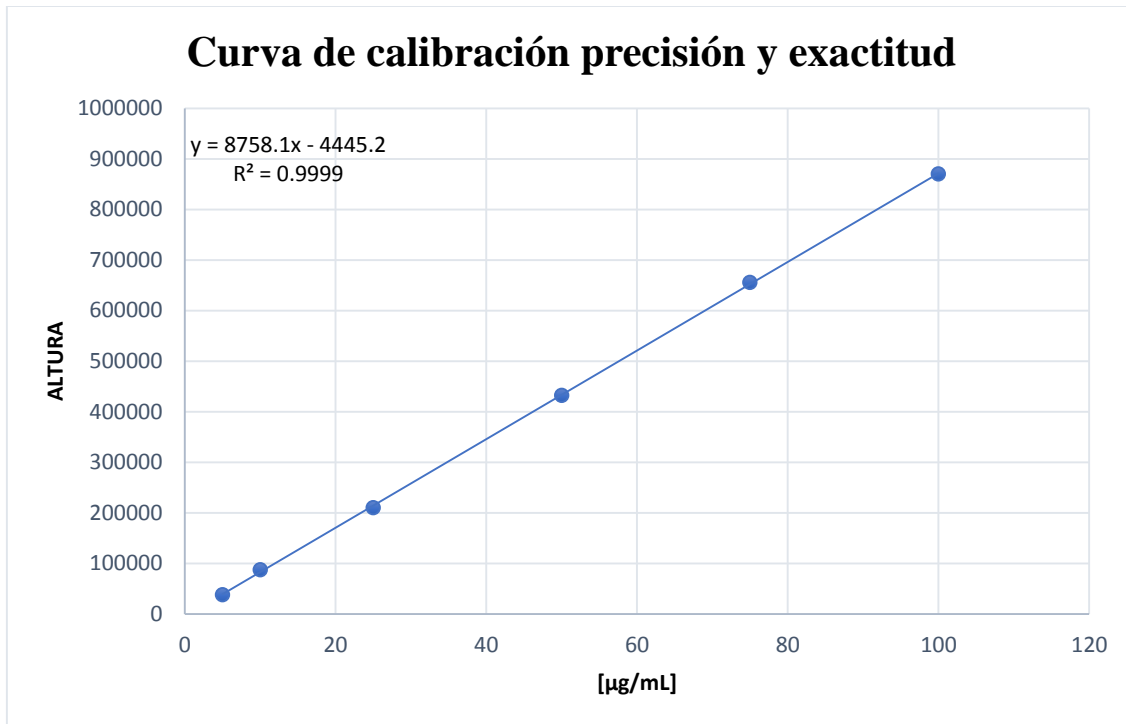


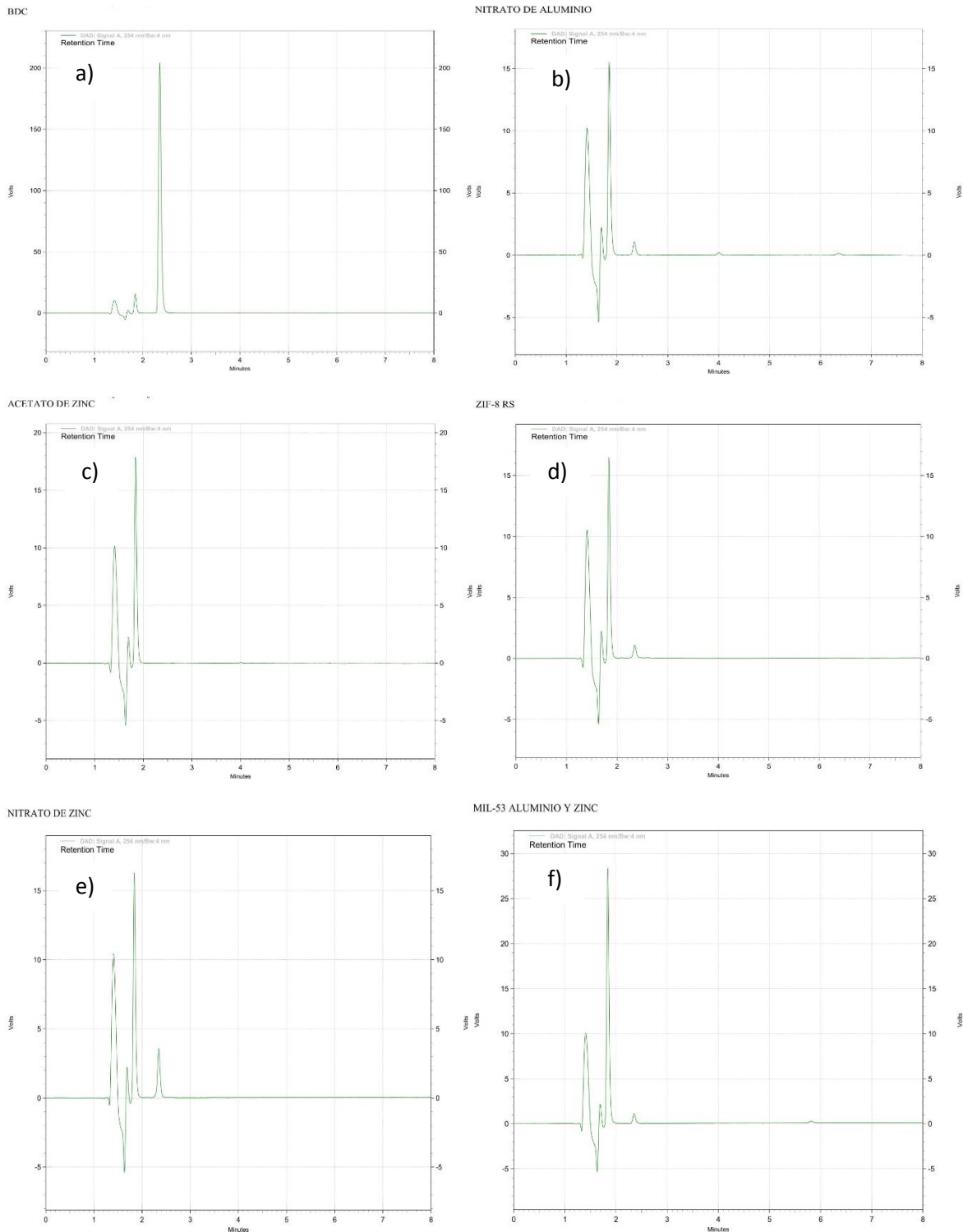
Figura 21. Curva de Precisión y Exactitud para LNZ por CLAR, se graficó altura vs [ $\mu\text{g/mL}$ ].

Tabla 28. Resultados Precisión y Exactitud (CV y % ER)

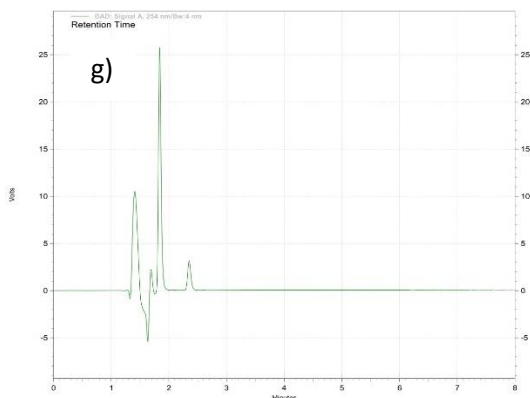
Muestra Control	Teórica [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Real [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	8	7.16	67173	1.12	-10.47
Media	35	34.37	305430	0.76	-1.81
Alta	85	82.44	726439	1.04	-3.02

## Selectividad

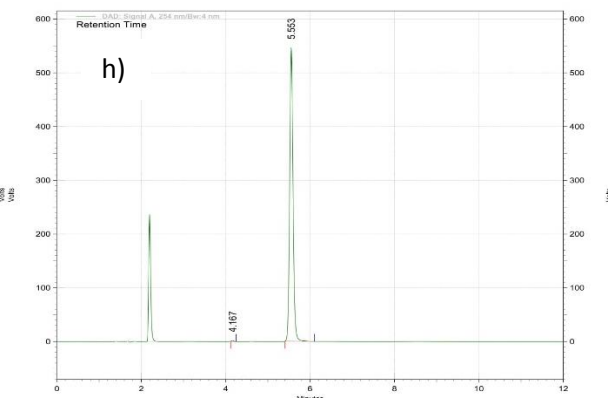
En la figura 22 se muestran los cromatogramas obtenidos de las materias primas que se ocupan para la síntesis de los Bio-MOF, así como los Bio-MOF-53 y ZIF-8 (estructura vacía). Evaluados con metanol.



MIL-53 ALUMINIO



BIO-MOF 1



BIO-MOF 2

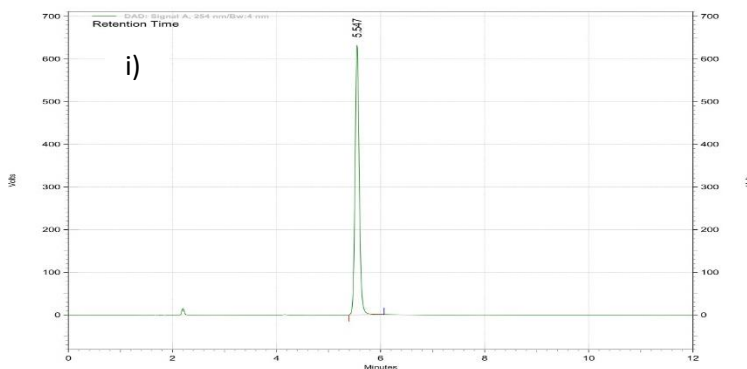


Figura 22. Cromatogramas obtenidos con el método CLAR para linezolid de las materias primas: a) BDC, b) nitrato de aluminio, c) acetato de zinc, d) ZIF-8 Rs, e) nitrato de zinc, f) MIL-53 (Al/Zn), g) MIL-53 (Al), h) Bio-MOF 1 y i) Bio-MOF 2 con metanol

### Repetibilidad

En la figura 23 se observa una curva de calibración en la cual se interpolaron 5 repeticiones a concentración de 8, 35 y 85  $\mu\text{g/mL}$ . En la tabla 29 se observa el CV igual a 0.75, 0.95 y 0.46 para las concentraciones anteriormente mencionadas, así como, el % ER igual a 16.72, 10.58 y 12.99

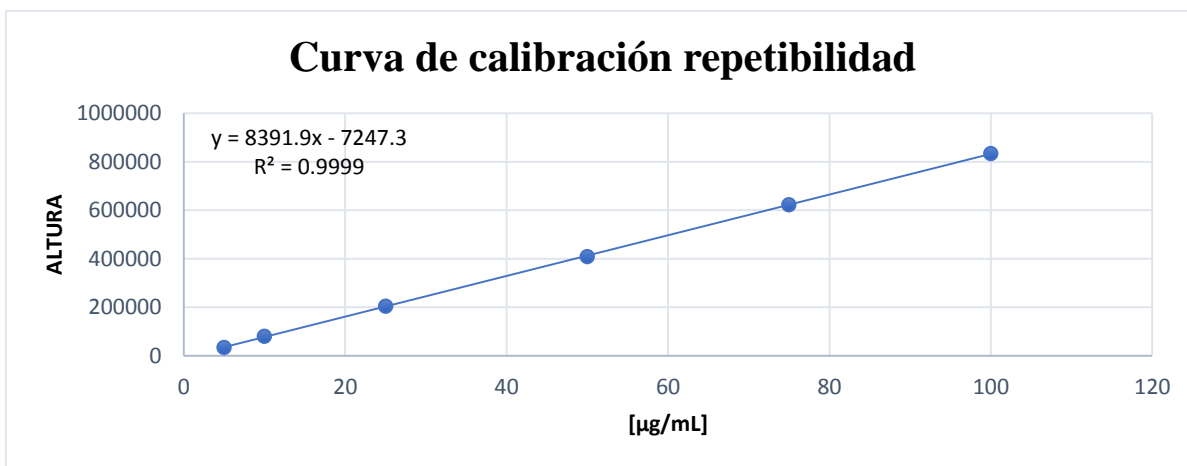


Figura 23. Curva de Repetibilidad para LNZ por CLAR, se graficó altura vs [ $\mu\text{g/mL}$ ].

**Tabla 29. Resultados Repetibilidad (CV y % ER)**

Muestra Control	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	8	6.66	63158	0.75	-16.72
Media	35	31.30	269881	0.95	-10.58
Alta	85	73.96	627882	0.46	-12.99

### Reproducibilidad

En la figura 24 se observa una curva de calibración en la cual se interpolaron 5 repeticiones a concentración de 8, 35 y 85 µg/mL. En la tabla 30 se observa el CV igual a 1.34, 1.24 y 0.92 para las concentraciones anteriormente mencionadas, así como, el % ER igual a 31.80, 6.69 y 2.20

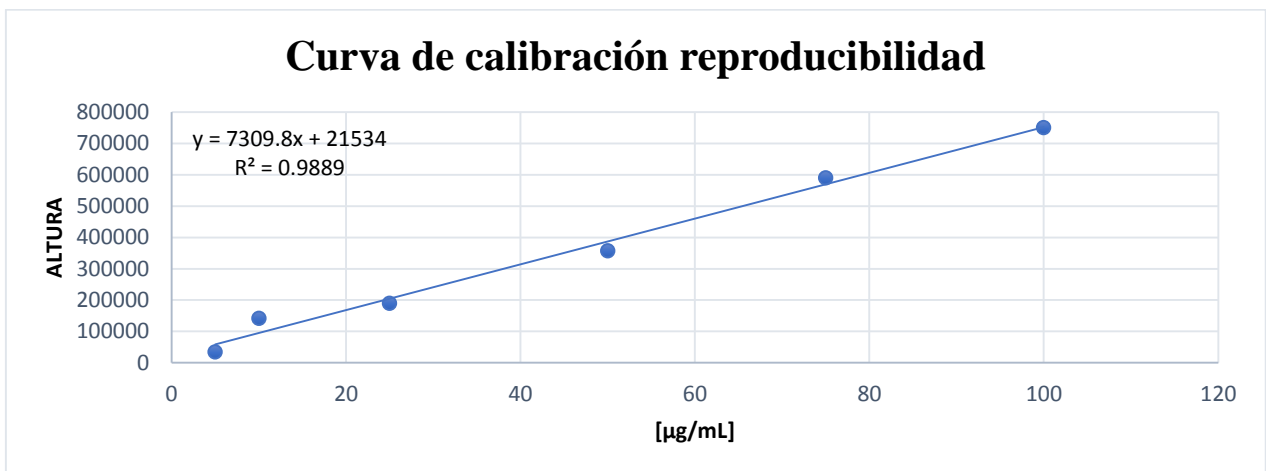


Figura 24. Curva de Reproducibilidad para LNZ por CLAR, se graficó altura vs [µg/mL].

**Tabla 30. Resultados Reproducibilidad (CV y % ER)**

Muestra Control	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	8	5.46	61414	1.34	-31.80
Media	35	37.34	294495	1.24	6.69
Alta	85	86.87	656520	0.92	2.20

### Estabilidad a largo plazo

En la figura 25 se observa una curva de calibración de estabilidad de una solución stock que se mantuvo en el refrigerador por 17 días a 4°C, tapada con aluminio. Donde se interpolaron 5

repeticiones a concentración de 8, 35 y 85 µg/mL. En la tabla 31 se observa el CV y el %ER para las concentraciones anteriormente mencionadas.

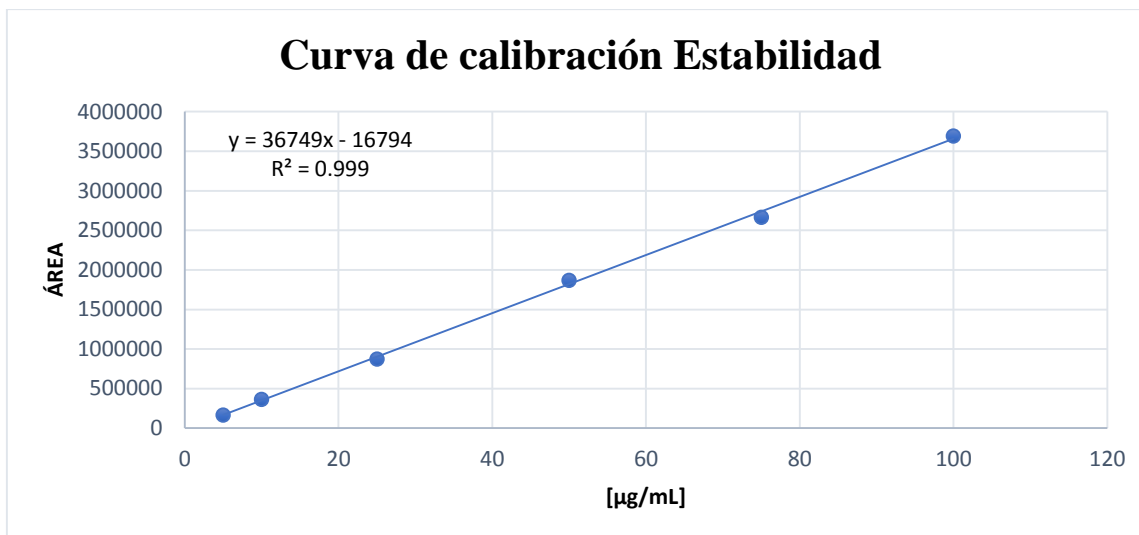


Figura 25. Curva de Estabilidad para LNZ por CLAR, se graficó área vs [µg/mL].

Tabla 31. Resultados de Estabilidad (CV y % ER)

Muestra Control	Teórica [µg/mL]	Real [µg/mL]	Promedio de las 5 inyecciones	Coefficiente de Variación (CV)	Error Relativo (%ER)
Baja	8	12.82	487817	1.11	60.22
Media	35	48.19	1787799	0.36	37.69
Alta	85	120.12	4431108	0.13	41.32

## OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

Se logró cumplir con todos los objetivos planteados en este proyecto, principalmente se consiguió desarrollar y validar un método analítico cromatográfico (CLAR) para la cuantificación de Linezolid y sulfadiazina en muestras de Bio-MOF, empleando las condiciones farmacopéicas en el caso del método para cuantificar sulfadiazina y con respecto a la linezolid se realizó una búsqueda en la bibliografía donde se han reportado diversas condiciones de análisis para la cuantificación de LNZ. De igual manera se desarrollaron las habilidades y conocimientos sobre (CLAR) en el problema analítico y en el manejo del cromatógrafo automatizado Agilent Infinity 1260 por parte del prestador del presente proyecto de servicio social.

La información recabada durante el desarrollo de esta investigación forma parte del proyecto de investigación “ Estructuras metal orgánicas Biodegradable (Bio-MOF) y su actividad profiláctica en la reparación de heridas”, el cual se realiza como una colaboración entre el Instituto de Investigación de Materiales de la Facultad de Química de la UNAM y el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (Laboratorio N-106) del Departamento de Sistemas Biológicos que se encuentra en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco; mismo que tiene como principal objetivo el desarrollo y evaluación de formas farmacéuticas innovadoras para liberación controlada.

## CONCLUSIONES

La validación del método por CLAR para cuantificar Sulfadiazina en muestras de Bio-MOF es satisfactorio, ya que las materias primas que se emplean en la síntesis de estos no interfirieron con el tiempo de retención del fármaco, por consecuente se afirma que el método es selectivo, preciso, exacto y reproducible. Además, las muestras analizadas presentan una estabilidad de 4 meses almacenadas a 4 °C y protegidas de la luz.

El desarrollo y la validación del método por CLAR para cuantificar Linezolid en muestras de Bio-MOF es satisfactorio brindando selectividad frente a las materias primas utilizadas en la síntesis de los Bio-MOF, además de ser preciso y exacto, así como reproducible. Sin embargo, no confirma una estabilidad de la muestra a largo plazo, ya que se presentó una alta variabilidad en muestras almacenadas por 17 días a 4 °C y protegidas de la luz,

El método es idóneo para la cuantificación de carga total y liberación de SDZ, así como de LNZ en NaOH y MeOH respectivamente, contenidos en una Bio-MOF como son la MIL-53 y la ZIF-8. Además, se obtuvieron coeficientes de correlación mayor a 0.998% en la evaluación de la linealidad en ambos fármacos empleando buffer de fosfatos pH 7.4 como medio de disolución, aprobando el parámetro de selectividad con la piel de cerdo. Lo cual, ambos métodos pueden emplearse en la cuantificación en pruebas de permeabilidad con membrana de piel de cerdo.

Se obtuvieron los aprendizajes y conocimientos necesarios para la validación, desarrollo y aplicación de los conocimientos en el problema analítico de cuantificar fármacos en una estructura tipo acarreador, por parte del prestador de servicio social.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ✚ Boak, M. L., Li, J., Nation, L. R., & Rayner, R. C. (2005). High-performance liquid chromatographic method for simple and rapid determination of linezolid in human plasma. *biomedical chromatography*, 20, 782-786.
- ✚ Borges, A. D. L., Del Ponte, G., Neto, A. F., & Carvalho, I. (2005). Síntese de sulfadiazina e sulfadiazina de prata em escala semi-micro: prática experimental em síntese de fármacos. *Química Nova*, 28(4), 727.
- ✚ Borner, K., Borner, H., & Lode, H. (2001). Determination of linezolid in human serum and urine by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Antimicrobial agents*, 18, 253-258.
- ✚ Cuba, V. (2013). ¿Por qué Validar Métodos Analíticos?. Disponible en la web: <https://es.slideshare.net/mariavanessacubatello/por-que-validar-mtodos-analticos>. Consultado el 20 julio 2019.
- ✚ Cattaneo, D., Baldelli, S., Conti, F., Cozzi, V., & Clementi, E. (2010). Determination of Linezolid in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. *Ther Drug Monit*, 32, 522-524.
- ✚ Fernández Riverón, F., López Hernández, J., Ponce Martínez, L. M., & Machado Betarte, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32, 0-0.
- ✚ García, F. (2001). Resistencia bacteriana a antibióticos. *Acta Médica Costarricense*, 43 (3): 1. Disponible en la web: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022001000300001](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022001000300001). Consultado el 19 septiembre 2018.
- ✚ Horcajada, P., S erre, c., Guillaume, m., & Francisco., B. ( 2008). Estructuras metálicas orgánicas porosas flexibles para una administración controlada de medicamentos. *130*, 6744-6780. Consultado el 20 de julio del 2019.
- ✚ Kawy, A. M., Weshahy, S. A., & Shokry, D. S. (2012). Validated Stability Indicating Assay of Linezolid by Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatographic Methods. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(1991-8178), 767-778.
- ✚ Sharma, N., Arrigoni, G., Ebinezer, L. B., Trentin, A. R., Franchin, C., Giaretta, S., . . . Masi, A. (2019). A proteomic and biochemical investigation on the effects of sulfadiazine in *Arabidopsis thaliana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 178, 146-158. Disponible en la web:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.008>. Consultado el 15 de julio del 2019.

- ✚ Skoog, D., Haller, J., & Crouch, S. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. 6ª. México, D.F.: CENGAGE LEARNING. Páginas 816-828. Consultado el 20 de julio del 2019.
- ✚ Taylor, R., Sunderland, B., Luna, G., & Czarniak, P. (2017). Evaluation of the stability of linezolid in aqueous solution and commonly used intravenous fluids. *Drug Desing, Development and Therapy*, 11, 2087-2097.
- ✚ Toutain, J., Boselli, E., Djabarouti, S., Allaouchiche, B., Xuereb, F., Bernadou, J.-M., . . . Dominique, B. (2004). Determination of Linezolid in plasma and bronchoalveolar lavage by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection using a fully automated extraction method. *Journal of Chromatography B*, 813, 145-150.
- ✚ Zhuang, J., Chun-Hong, K., Lien-Yang, C., De-Yu, L., Weerapana., E., & Tsung, C.-K. (2014). Optimized Metal Organic Framework Nanospheres for Drug Delivery: Evaluation of Small-Molecule Encapsulation. *ACS-NANO*, 8, 2812-2819. Consultado el 20 de julio del 2019

---

**Vo. Bo de los contenidos académicos**



---

**Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda**



---

**M. en C. Farmacéuticas Javier Águila Rosas**



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Unidad Xochimilco

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO (CLAR) PARA CUANTIFICAR SULFADIAZINA Y LINEZOLIDA EN BIO-MOF.**

**PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE A:**

**EVALUACIÓN DE PRODUCTOS RELACIONADOS CON LA SALUD.**

**ALUMNO:** JORGE LUIS IBARRA BELLO

**MATRICULA:** 2143024115

**DIRECCIÓN:** CALLE HACIENDA CANUTILLO #2, COLONIA VILLA QUIETUD,  
DELEGACIÓN COYOACÁN.

**CODIGO POSTAL:** 04960

**TELEFONO:** Casa: (739) 39 5 51 42, Cel: 5535500730

**ASESORES:**

**ASESOR INTERNO:** DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA.

**ASESOR EXTERNO:** M. en C.F. JAVIER ÁGUILA ROSAS.

**LUGAR DE REALIZACIÓN:** LABORATORIO DE FARMACIA MOLECULAR Y  
LIBERACIÓN CONTROLADA N-106, UAM-X.

**FECHA DE INICIO DEL PROYECTO:** 24 DE SEPTIEMBRE 2018

**FECHA DE TÉRMINO DEL PROYECTO:** 29 DE MARZO 2019

## RESUMEN

En el presente informe se realizaron actividades de validación y desarrollo de métodos analíticos cromatográficos (CLAR) para la cuantificación de Sulfadiazina (SDZ) y Linezolidina (LNZ) en muestras de Bio-MOF. Para adaptar y validar el método SDZ se empleó como punto de partida una técnica farmacopéica, donde se reportan las condiciones de análisis, mientras que para el desarrollo y posterior validación del método LNZ, primeramente, se realizó una búsqueda de artículos científicos donde ya se han reportado diversas técnicas empleadas en la validación por CLAR. Se tomó como referente una técnica con las condiciones de análisis reportadas por (*Boak, Li, Nation, & Rayner, 2005*) siendo la base para adaptar y validar el método LNZ reportado en este informe. Se evaluaron los parámetros de Linealidad, Límite inferior de cuantificación (LIC), Precisión y Exactitud, Selectividad (materias primas empleadas en la síntesis de los Bio-MOF), Repetibilidad, Reproducibilidad y Estabilidad a largo plazo en ambos métodos (SDZ y LNZ). Se obtuvieron resultados satisfactorios posterior a la validación de ambos métodos, destacando que ambos métodos son selectivos, es decir, que tanto la estructura vacía como las materias primas empleadas para las síntesis de los Bio-MOF no influyen en el tiempo de retención (4 min) tanto de SDZ como de LNZ.

## OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

### Objetivo general

Adaptar y validar un método analítico cromatográfico (CLAR) para la cuantificación de Sulfadiazina y Linezolidina en muestras de Bio-MOF.

### Objetivos específicos

Adaptar y validar un método analítico cromatográfico (CLAR) para la cuantificación de Sulfadiazina en muestras de Bio-MOF, a partir de una técnica farmacopéica.

Desarrollar y validar un método analítico cromatográfico (CLAR) para la cuantificación de linezolidina, utilizando técnicas publicadas en distintas fuentes bibliográficas.

Desarrollar por parte del prestador del presente proyecto del servicio social, las habilidades analíticas suficientes para aplicar los conocimientos teóricos sobre CLAR en el problema analítico de nuevos acarreadores como los Bio-MOF.

## CONCLUSIONES

La validación del método por CLAR para cuantificar Sulfadiazina en muestras de Bio-MOF es satisfactorio, ya que las materias primas que se emplean en la síntesis de estos no interfirieron con el tiempo de retención del fármaco, por consiguiente se afirma que el método es selectivo, preciso, exacto y reproducible. Además, las muestras analizadas presentan una estabilidad de 4 meses almacenadas a 4 °C y protegidas de la luz.

El desarrollo y la validación del método por CLAR para cuantificar Linezolid en muestras de Bio-MOF es satisfactorio brindando selectividad frente a las materias primas utilizadas en la síntesis de los Bio-MOF, además de ser preciso y exacto, así como reproducible. Sin embargo, no confirma una estabilidad de la muestra a largo plazo, ya que se presentó una alta variabilidad en muestras almacenadas por 17 días a 4 °C y protegidas de la luz,

El método es idóneo para la cuantificación de carga total y liberación de SDZ, así como de LNZ en NaOH y MeOH respectivamente, contenidos en una Bio-MOF como son la MIL-53 y la ZIF-8. Además, se obtuvieron coeficientes de correlación mayor a 0.998% en la evaluación de la linealidad en ambos fármacos empleando buffer de fosfatos pH 7.4 como medio de disolución, aprobando el parámetro de selectividad con la piel de cerdo. Lo cual, ambos métodos pueden emplearse en la cuantificación en pruebas de permeabilidad con membrana de piel de cerdo.

Se obtuvieron los aprendizajes y conocimientos necesarios para la validación, desarrollo y aplicación de los conocimientos en el problema analítico de cuantificar fármacos en una estructura tipo acarreador, por parte del prestador de servicio social.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ✚ Boak, M. L., Li, J., Nation, L. R., & Rayner, R. C. (2005). High-performance liquid chromatographic method for simple and rapid determination of linezolid in human plasma. *biomedical chromatography*, 20, 782-786.
- ✚ Borges, A. D. L., Del Ponte, G., Neto, A. F., & Carvalho, I. (2005). Síntese de sulfadiazina e sulfadiazina de prata em escala semi-micro: prática experimental em síntese de fármacos. *Química Nova*, 28(4), 727.
- ✚ Borner, K., Borner, H., & Lode, H. (2001). Determination of linezolid in human serum and urine by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Antimicrobial agents*, 18, 253-258.
- ✚ Cuba, V. (2013). ¿Por qué Validar Métodos Analíticos?. Disponible en la web: <https://es.slideshare.net/mariavanessacubatello/por-que-validar-mtodos-analticos>. Consultado el 20 julio 2019.
- ✚ Cattaneo, D., Baldelli, S., Conti, F., Cozzi, V., & Clementi, E. (2010). Determination of Linezolid in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. *Ther Drug Monit*, 32, 522-524.
- ✚ Fernández Riverón, F., López Hernández, J., Ponce Martínez, L. M., & Machado Betarte, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32, 0-0.
- ✚ García, F. (2001). Resistencia bacteriana a antibióticos. *Acta Médica Costarricense*, 43 (3): 1. Disponible en la web: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022001000300001](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022001000300001). Consultado el 19 septiembre 2018.
- ✚ Horcajada, P., S erre, c., Guillaume, m., & Francisco., B. ( 2008). Estructuras metálicas orgánicas porosas flexibles para una administración controlada de medicamentos. *130*, 6744-6780. Consultado el 20 de julio del 2019.
- ✚ Kawy, A. M., Weshahy, S. A., & Shokry, D. S. (2012). Validated Stability Indicating Assay of Linezolid by Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatographic Methods. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(1991-8178), 767-778.
- ✚ Sharma, N., Arrigoni, G., Ebinezer, L. B., Trentin, A. R., Franchin, C., Giaretta, S., . . . Masi, A. (2019). A proteomic and biochemical investigation on the effects of sulfadiazine in *Arabidopsis thaliana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 178, 146-158. Disponible en la web:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.008>. Consultado el 15 de julio del 2019.

- ✚ Skoog, D., Haller, J., & Crouch, S. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. 6ª. México, D.F.: CENGAGE LEARNING. Páginas 816-828. Consultado el 20 de julio del 2019.
- ✚ Taylor, R., Sunderland, B., Luna, G., & Czarniak, P. (2017). Evaluation of the stability of linezolid in aqueous solution and commonly used intravenous fluids. *Drug Desing, Development and Therapy*, 11, 2087-2097.
- ✚ Toutain, J., Boselli, E., Djabarouti, S., Allaouchiche, B., Xuereb, F., Bernadou, J.-M., . . . Dominique, B. (2004). Determination of Linezolid in plasma and bronchoalveolar lavage by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection using a fully automated extraction method. *Journal of Chromatography B*, 813, 145-150.
- ✚ Zhuang, J., Chun-Hong, K., Lien-Yang, C., De-Yu, L., Weerapana., E., & Tsung, C.-K. (2014). Optimized Metal Organic Framework Nanospheres for Drug Delivery: Evaluation of Small-Molecule Encapsulation. *ACS-NANO*, 8, 2812-2819. Consultado el 20 de julio del 2019



**Vo. Bo de los contenidos académicos**



---

**Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda**



---

**M. en C. Farmacéuticas Javier Águila Rosas**