

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 DE SERVICIO SOCIAL

NOMBRE DEL PROYECTO: Validación parcial de un método analítico por HPLC para la cuantificación de Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol en solución salina de Hank

ALUMNO: Oscar Feliciano Reyes

MATRÍCULA: 2183030606

ASESOR INTERNO: M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña (No. Económico: 15677)

ASESOR EXTERNO: M. en C. Inés Fuentes Noriega (Ced. Prof. : 1426701)

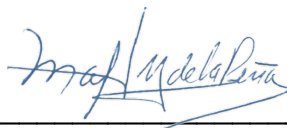
LUGAR DE REALIZACIÓN: Facultad de Química de la UNAM, Laboratorio 113, Conjunto E.

FECHA DE INICIO: 17-02-2023

FECHA DE FINALIZACIÓN: 17-08-2023

REVISIÓN FINAL

Asesor interno

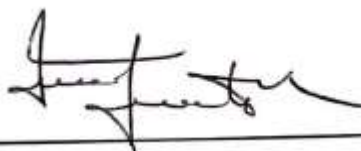


M. en C. Marcela Hurtado de la Peña

Número económico: 15677

Departamento de Sistemas Biológicos

Asesor externo



M. en C. Inés Fuentes Noriega

Cédula Profesional: 1426701

Laboratorio 113, Conjunto E, Facultad de Química UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, por ser la “casa abierta al tiempo” y recibirme de la mejor manera, por instruirme, alimentarme, y cuidarme; sin su ayuda no habría podido lograrlo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrir sus puertas a un estudiante de otra alma máter, por brindar todo el apoyo y materiales para la realización del proyecto, y sobre todo por dejarme conocer a personas tan sabias e inteligentes, que compartieron su conocimiento sin dudar. Y por dejarme demostrar que la UAM y la UNAM son universidades hermanas, no rivales.

A la M. en C. Inés Fuentes Noriega, por aceptarme en el laboratorio e involucrarme en un proyecto tan importante, por su apoyo incondicional, su atención y su comprensión, gracias por permitirme ser parte del gran equipo del laboratorio 113.

A la gran Dra. Nancy Vara Gama, las palabras no son suficientes para expresar mi gratitud, por compartir su conocimiento, experiencias, aventuras y desventuras, por su asesoría vocacional, sus pláticas, regaños y llamados de atención que me permitieron progresar dentro del laboratorio, gracias por demostrar su bondad, comprensión y su compañía en las largas horas de las corridas analíticas, es un ejemplo de compañerismo y solidaridad.

A la M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña, por ser mi asesora interna, por su apoyo durante todo el proceso de registro y por sus clases impartidas durante mi tiempo de estudiante, de no ser por usted mi interés por los métodos analíticos no habría florecido.

DEDICATORIAS

A mi familia:

A mi papá, gracias a su apoyo incondicional y ayuda pude culminar este servicio, es un ejemplo de perseverancia y ayuda desinteresada.

A mis hermanos Frank, Zoe y Britany, que con sus ocurrencias y risas me dieron fortaleza para seguir en los momentos más difíciles.

A las pequeñas almas de la casa, Nébula y Andrómeda, que me han enseñado y demostrado el amor más puro que existe.

Al gran patriarca de la casa, mi abuelito Manuel, sus consejos me sirvieron mucho, y sé que en el futuro me seguirán sirviendo.

A mis amigos:

Al team Ovogénesis y tortilla, Yoali, Aylin, Pame y Dany, a pesar de tomar rumbos diferentes, compartimos un lazo muy fuerte, me enseñaron a reír y a ser yo mismo, les quiero mucho. Yoali, creo que fue con quien más congenié, un placer haber compartido salón de clases contigo, gracias por ser una gran amiga.

A mis grandes amigas del bus 2, Tonatzy, Fer y Maritza. Tona, en poco tiempo nos convertimos en grandes amigos, gracias por escucharme y aconsejarme, por ser esa confidente y por tu gran optimismo.

A los QFB más geniales que conozco, Carlos, Jovan, y Mayra, les admiro, y les estimo muchísimo, gracias por compartir conmigo tanto.

A la QFB Yatziry, mi gran amiga y consejera, gracias por ayudarme siempre, por tu apoyo tanto en lo académico como en la iglesia.

A Esmeralda, después de tantas aventuras y desventuras, nuestra amistad me ayudó sobre todo al terminar la licenciatura.

A mis amigos de la preparatoria, Leonardo, Priscila e Ignacio, no sé qué habría sido de mi sin sus consejos, aunque no nos vimos durante mucho tiempo, los quiero.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
ANTECEDENTES	5
METODOLOGÍA	13
Materiales, reactivos, equipos e instrumentos:	13
Preparación de soluciones	14
Procedimiento experimental:	16
Determinación de acetaminofén por espectrofotometría UV-Vis	17
Validación parcial del método de cuantificación de Casiopeína III-Ea, clorhidrato de ranitidina y clorhidrato de propranolol en solución salina de Hank	17
Análisis estadístico de los datos	21
ACTIVIDADES REALIZADAS	22
METAS ALCANZADAS	23
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS	46
RESUMEN	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Curva de calibración de acetaminofén	17
Tabla 2. Condiciones cromatográficas para Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol	18
Tabla 3. Curva de calibración de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank	18
Tabla 4. Curva de calibración de clorhidrato de ranitidina en solución salina de Hank .	19
Tabla 5. Curva de calibración de clorhidrato de propranolol en solución salina de Hank	19
Tabla 6. Muestras control de Casiopeína III-Ea	20
Tabla 7. Muestras control de clorhidrato de ranitidina.....	20
Tabla 8. Muestras control de clorhidrato de propranolol	20
Tabla 9. Absorbancias obtenidas de la curva de calibración de acetaminofén	24
Tabla 10. Resultados de variabilidad del analista con acetaminofén	26
Tabla 11. Resultados de linealidad de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank ..	28
Tabla 12. Resultados de repetibilidad (día 1) de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank.....	29
Tabla 13. Resultados de repetibilidad (día 2) de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank.....	29
Tabla 14. Resultados de reproducibilidad de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank.....	30
Tabla 15. Resultados de linealidad de ranitidina en solución salina de Hank	32
Tabla 16. Resultados de repetibilidad (día 1) de ranitidina en solución salina de Hank	33
Tabla 17. Resultados de repetibilidad (día 2) de ranitidina en solución salina de Hank	33
Tabla 18. Resultados de reproducibilidad ranitidina en solución salina de Hank	34
Tabla 19. Resultados de linealidad de propranolol en solución salina de Hank.....	36
Tabla 20. Resultados de repetibilidad (día 1) de propranolol en solución salina de Hank	37
Tabla 21. Resultados de repetibilidad (día 2) de propranolol en solución salina de Hank	37
Tabla 22. Resultados de reproducibilidad de propranolol en solución salina de Hank	38
Tabla 23. Resumen de la validación parcial.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de Casiopeína III-Ea.....	6
Figura 2. Barrido de la solución de acetaminofén (16 µg/mL)	24
Figura 3. Curva de calibración de acetaminofén	25
Figura 4. Cromatogramas de selectividad de Casiopeína III-Ea a una longitud de onda de 273 nm. a) Solución salina de Hank, b) Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank	27
Figura 5. Curva de calibración de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank	28
Figura 6. Cromatogramas de selectividad de ranitidina a una longitud de onda de 290 nm. a) Solución salina de Hank, b) Clorhidrato de ranitidina en solución salina de Hank	31
Figura 7. Curva de calibración de ranitidina en solución salina de Hank	32
Figura 8. Cromatogramas de selectividad de propranolol a una longitud de onda de 322 nm. a) Solución salina de Hank, b) Propranolol en solución salina de Hank.....	35
Figura 9. Curva de calibración de propranolol en solución salina de Hank	36

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en los últimos años el cáncer ha representado una de las principales causas de mortalidad en el continente americano, causando aproximadamente 1.4 millones de muertes en el 2020, con un número de casos de 4 millones, con una proyección hacia el 2040 de un aumento hasta 6 millones de casos. En México, datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportan que en el 2020 se registraron aproximadamente 60 mil defunciones por cáncer y se ha observado que de cada 100 ingresos hospitalarios 73 son por cáncer en tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados, especialmente en la población de 0 a 19 años.

En este sentido, es importante la prevención, no obstante, si la enfermedad se encuentra presente se debe actuar rápido para tener un tratamiento efectivo; la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que se logran altas tasas de curación en algunos cánceres como el seminoma y otros tipos de leucemias y linfomas infantiles si se administra un tratamiento adecuado.

Se han desarrollado distintos fármacos para el tratamiento de leucemia, entre estos se pueden encontrar las Casiopeínas, una familia de compuestos de coordinación de cobre, con una fórmula general Cu (N-N)(O-O)NO_3 o Cu (N-N)(O-N)NO_3 , los cuales fueron diseñados como una alternativa menos tóxica al Cis-platino. Entre estas moléculas destaca la Casiopeína III-Ea, la cual tiene actividad citotóxica, genotóxica y antineoplásica, y se ha presentado como una alternativa en el tratamiento de distintos tipos de leucemia.

En el desarrollo de nuevos fármacos, es importante demostrar el proceso de absorción, distribución, metabolismo y eliminación; si bien, los ensayos *in vivo* son la prueba por excelencia, existen alternativas *in vitro* que permiten predecir el comportamiento *in vivo*. Entre estas pruebas se pueden encontrar los ensayos de permeabilidad en células, especialmente en líneas celulares como Caco2 o MDCK, las cuales demuestran el paso de las moléculas a través de una monocapa celular, que puede representar las condiciones gastrointestinales.

Sin embargo, al realizar este tipo de estudios, se necesita una metodología que permita cuantificar el fármaco o molécula, misma que debe arrojar datos confiables y reproducibles. De acuerdo con la normativa nacional e internacional (guías de la FDA, EMA, ICH, y la NOM 177), los métodos bioanalíticos (aquellos en los cuales se use una matriz biológica como sangre o plasma) deben realizarse con el equipo y la instrumentación especial y de igual forma deben validarse, es decir, cumplir con parámetros como linealidad, precisión, exactitud, estabilidad, etc. No obstante, cuando el método ha sido utilizado y estandarizado por otro laboratorio y se desea implementar en un laboratorio diferente, se puede recurrir a una validación parcial.

En el presente trabajo se presenta la validación parcial del método analítico para la cuantificación de Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol (estándares de baja y alta permeabilidad), así como su aplicación dentro de un estudio de permeabilidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las Casiopeínas representan un grupo potencial de fármacos antineoplásicos, en diversos estudios han demostrado tener actividad contra distintos tipos de leucemia, entre otros cánceres, disminuyendo la cantidad de células cancerígenas y/o el tamaño de tumores. Sin embargo, al desarrollar un nuevo fármaco es importante demostrar sus capacidades biofarmacéuticas, como aquellas que permitan al principio activo tener una buena absorción para su posterior acción en la diana terapéutica. Entre los distintos ensayos que se puede realizar para demostrar estas características se puede encontrar la prueba de permeabilidad, en la cual se cuantifica la cantidad de fármaco que atraviesa una monocapa celular, y permite obtener el valor de permeabilidad aparente y los mecanismos de transporte. Sin embargo, de acuerdo con las normativas nacionales e internacionales, es de suma importancia contar con un método analítico que permita obtener datos confiables, exactos y precisos, por lo que cada método debe validarse previamente, es decir, deben realizarse las pruebas necesarias para demostrar que es reproducible y confiable, y que, si llegase a tener variaciones, sean mínimas y se encuentren dentro de los rangos permisibles. Asimismo, cuando un método ya se ha desarrollado y se comienza su uso en otro laboratorio es importante realizar una validación parcial, que no contempla todos los parámetros de la validación total, ya que previamente se ha demostrado su efectividad. Es importante, además, que los métodos se realicen en equipo con buena sensibilidad, especialmente los métodos bioanalíticos, en los cuales la cantidad de analito a cuantificar es muy baja.

OBJETIVO GENERAL

Realizar una validación parcial de un método analítico por HPLC para cuantificar Casiopeína III – Ea, ranitidina y propranolol en solución salina de Hank para un estudio de permeabilidad en células MDCK

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una determinación de acetaminofén por espectrofotometría UV-Vis para evaluar linealidad, repetibilidad y reproducibilidad del analista.
- Evaluar los parámetros de la validación parcial del método (selectividad, linealidad, adecuabilidad, precisión y exactitud) para Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol.
- Comparar los resultados obtenidos con las especificaciones descritas en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.
- Aplicar el método para la cuantificación de Casiopeína III – Ea en muestras de un estudio de permeabilidad.

ANTECEDENTES

Casiopeínas

Los metales suelen tener aplicaciones en la vida diaria aparte de la minería y metalúrgica, se pueden encontrar en electrónica o hasta medicina, como antimicrobianos, antiparasitarios, agentes contra artritis, para el tratamiento de diabetes, entre otros. No obstante, en la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos, se ha utilizado el cobre (Cu (II)), que, si bien puede tener efectos tóxicos en algunas presentaciones, ha sido de utilidad; uno de estos agentes son las Casiopeínas, los cuales han sido diseñados para contener un centro quelante de cobre, con una fórmula general: Cu (N-N)(O-O)NO_3 o Cu (N-N)(O-N)NO_3 (Álvarez-Barrera *et al*, 2016; García-Ramos *et al*, 2019; Vara-Gama *et al*, 2021; Rufino-González *et al*, 2019). Una de las ventajas del uso de cobre en estas moléculas es que disminuye su toxicidad, además que son más estables y tienen una mayor efectividad ya que este metal puede funcionar como cofactor para algunas enzimas relacionadas al estrés oxidativo, disminuyendo el daño a células sanas, atacando células cancerígenas. Existe una gran familia de Casiopeínas, que llega a comprender hasta 100 distintas moléculas, entre las que se encuentran Casiopeína III-la, Casiopeína III-gly, y Casiopeína III-Ea (Álvarez-Barrera *et al*, 2016).

Casiopeína III-Ea

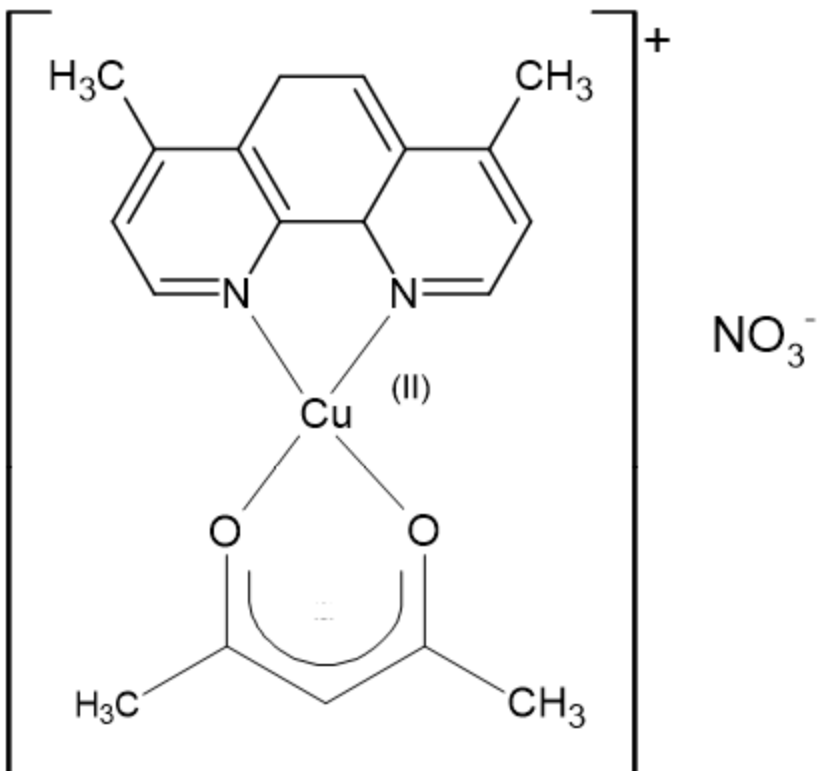


Figura 1. Estructura química de Casiopeína III-Ea

De entre la gran cantidad de Casiopeínas, se pueden diferenciar algunas moléculas dependiendo del sustituyente que contengan, ya sea una bipyridina (como la Casiopeína III-Ia) o una fenantrolina (Casiopeína III-Ea). Casiopeína III-Ea (figura 1) es un ácido débil con un valor de pka de 5.01 que presenta una buena solubilidad acuosa (Vara-Gama *et al*, 2021) y además, se presenta como un polvo azul muy cohesivo.

La Casiopeína III-Ea ha demostrado actividad antineoplásica con una capacidad de reducir el tamaño de tumores e inducir efectos antiproliferativos y antiapoptóticos, además de ser un agente antigirdiasis. Ha demostrado una gran actividad como agente contra la leucemia mieloblástica crónica (Álvarez-Barrera *et al*, 2016; Vara-Gama *et al*, 2021; García-Ramos *et al*, 2019).

Al ser un fármaco en desarrollo, es indispensable recopilar información sobre su comportamiento *in vivo*, como absorción, distribución, metabolismo y eliminación (García-Ramos *et al*, 2019). Entre los ensayos que permiten elucidar el proceso de absorción se puede encontrar el estudio de permeabilidad.

Estudios de permeabilidad

Para lograr un efecto terapéutico, los fármacos deben ser absorbidos, es decir, pasar una serie de barreras celulares, como la barrera intestinal, que se compone de una serie de monocapas celulares. Entre los métodos más utilizados para predecir la absorción de fármacos se pueden encontrar aquellos basados en líneas celulares, como las células Caco-2 que son células epiteliales colorrectales con adenocarcinoma, que expresan enzimas y transportadores con importancia en los enterocitos; y las células MDCK o células Madine-Darby de riñón de perro que contienen una menor cantidad de enzimas y transportadores. Ignorando su origen no-humano, es más frecuente el uso de células MDCK para estudios de permeabilidad, especialmente por su facilidad de manejo, un menor tiempo de cultivo, una apropiada predicción de la absorción intestinal humana, y una aproximación muy cercana a la permeabilidad pasiva. Estos estudios realizados en células además permiten averiguar el mecanismo de transporte de la molécula (transporte activo o pasivo). De acuerdo con la FDA y la ICH, al evaluar un nuevo compuesto se debe comparar junto con un estándar de alta permeabilidad, y uno de baja o media, en este caso, propranolol y ranitidina respectivamente. El procedimiento general de los estudios de permeabilidad utilizando las células MDCK contempla el uso de celdas Transwell, colocando una cantidad determinada de células en cada celda, posteriormente se añade la solución con el fármaco a estudiar ya sea en el compartimiento apical o basolateral para evaluar su paso a través de la monocapa celular (Zito, 2021; Chen *et al*, 2018), de esta forma se van tomando alícuotas a determinados tiempos para ser analizadas con un método confiable, previamente validado.

Validación de métodos bioanalíticos

La importancia de validar un método analítico recae en que la información brindada por este tiene que ser confiable, pues ayudan a demostrar la seguridad, calidad y eficacia de los fármacos o productos biológicos. De acuerdo con la Food and Drug Administration (FDA), la European Medicine Agency (EMA) y la International Conference of Harmonization (ICH) y con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana 177, un método bioanalítico es aquel en el cual se evalúan analitos y biomarcadores en una matriz biológica determinada (como sangre, plasma, u orina).

La validación de los métodos debe responder cuestionamientos clave para demostrar la confiabilidad, como si el método mide o tiene una respuesta ante determinado analito, o si existe alguna variación entre mediciones, cuál es el rango entre mediciones que permite obtener datos confiables, e incluso cómo se debe recolectar, manejar, almacenar y analizar las muestras. De igual forma, es importante que el analista esté familiarizado con el analito a estudiar, es decir, que conozca sus propiedades fisicoquímicas, el metabolismo *in vitro* – *in vivo*, o su unión a proteínas y considerar estos aspectos en el análisis.

Para llevar a cabo una validación exitosa, las autoridades regulatorias han determinado ciertos parámetros que determinan que los resultados son confiables, tales como linealidad, selectividad, especificidad, exactitud, precisión, estabilidad, entre otros.

No obstante, existe una diferencia importante entre una validación total y parcial, mientras que la validación total se debe realizar para cualquier nuevo método analítico o aquellos que se basan en la literatura, la validación parcial se realiza en situaciones en las cuales existen cambios mínimos en el método que ha sido previamente validado, por lo que no se requiere una validación total, estos cambios pueden ser la transferencia del método a un laboratorio distinto, cambios en el equipo, variaciones en el rango de calibración o en los volúmenes de muestreo, diferentes matrices biológicas, etc.

De acuerdo con la FDA, la ICH y la EMA, algunos parámetros de la validación son:

Selectividad: es la capacidad del método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de sustancias propias de la matriz biológica. Esta se debe evaluar usando muestras blanco (es decir, muestras de la matriz sin añadir el analito o el estándar interno) y se deben obtener de al menos 6 fuentes.

Especificidad: Es la capacidad del método bioanalítico de detectar y diferenciar el analito de otras sustancias, incluidas sustancias relacionadas (metabolitos, isómeros, impurezas o productos de degradación del analito).

Linealidad, curva de calibración y rango: La curva de calibración demuestra una relación entre la concentración nominal de la concentración del analito y la respuesta observada, esta concentración nominal debe encontrarse en un rango específico. Las curvas deben

prepararse en la misma matriz biológica de estudio añadiendo concentraciones conocidas del analito. Se deben usar un mínimo de seis niveles de concentración además de la muestra blanco (que no contiene analito ni estándar interno) y una muestra cero (que no contiene analito, pero si estándar interno).

Exactitud: Describe la cercanía del valor obtenido por el método y la concentración nominal del analito, suele expresarse en porcentaje. Este parámetro se evalúa usando muestras control (bajo, medio, alto) que son independientes de la curva de calibración.

Precisión: describe la cercanía entre las mediciones repetidas del analito. Suele expresarse como coeficiente de variación.

Estabilidad: permite asegurar que cada paso durante la preparación de las muestras y el mismo análisis, así como las condiciones de almacenamiento no afectan la concentración del analito en las muestras (European Medicines Agency, 2022; ICH Expert Working Group, 2022; U.S. Food and Drug Administration, 2018).

HPLC

HPLC (High Performance Liquid Chromatography por sus siglas en inglés) o Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en español, es una técnica usada para la separación, identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla. Está basada bajo el mismo principio que la cromatografía en columna, a diferencia que la fase móvil es inyectada a la columna a presión y no con gravedad. Las muestras son inyectadas en la columna que contiene la fase estacionaria, de acuerdo con el tipo de columna y la interacción que tenga con el analito y la fase estacionaria, se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra, los cuales se detectan usando diferentes tipos de detectores. Tiene distintas ventajas, como que puede analizar distintos analitos con respuestas precisas y altamente reproducibles, tiene una operación automatizada y una gran capacidad de separación con una detección de alta sensibilidad (Adel *et al*, 2021).

Tipos de HPLC

De acuerdo con Sadapha, 2022 y Ali, 2022, las técnicas de HPLC pueden ser clasificadas de acuerdo con :

- Su finalidad de operación: es decir, de tipo analítico o preparativo.
- El principio de la separación: como la cromatografía de afinidad, de adsorción, de partición, de exclusión, de intercambio iónico, o quiral.
- La técnica de elusión: si se usa una separación en gradiente o isocrática.
- El modo de operación: fase normal, o fase reversa.

HPLC de fase normal: En esta técnica la fase móvil es no polar, mientras que la fase estacionaria es polar. Como en cualquier otra técnica de cromatografía, el principio de la retención del analito se basa en su interacción con la fase estacionaria, por lo que una mayor polaridad del analito significa un incremento en la capacidad de adsorción de la columna, y por ende, un aumento en el tiempo de retención, por otro lado, analitos no polares no podrán interactuar con la columna por mucho tiempo, y su tiempo de retención será corto. Las fases estacionarias más comunes son de sílice modificada con grupos cianopropil, aminopropil, o dioles.

HPLC de fase reversa (RP-HPLC): En esta técnica la fase estacionaria es no polar, y la fase móvil es polar o moderadamente polar. De forma casi contraria a la cromatografía de fase normal, los analitos de baja polaridad son retenidos por más tiempo debido a su capacidad de adsorción en la columna, con mayores tiempos de retención.

Instrumentación del HPLC

Las partes típicas de un cromatógrafo incluyen:

- Un reservorio de solventes: las fases móviles usadas durante el análisis se deben depositar en recipientes de cristal. Estas son usualmente una mezcla de componentes líquidos no polares y polares, en las cuales la proporción varía de acuerdo con la composición de la muestra o la naturaleza del analito. Para la cromatografía de fase normal usualmente se usan solventes no polares, mientras que para la de fase reversa, se usa una mezcla de solventes polares y no polares. Estos solventes deben ser de alta pureza, denominados en ocasiones "Solventes

HPLC". Antes de inyectar las fase móviles al cromatógrafo y posteriormente a la columna, deben ser filtradas (para evitar el paso de partículas), y desgasificadas, (para evitar la presencia de burbujas que interfieran en la respuesta del detector y que puedan dañar la columna).

- Bomba: la bomba puede ser comparada con el corazón humano, que bombea continuamente la sangre a través de las venas por todo el cuerpo. A diferencia del corazón, que puede tener distintas variaciones en la presión a la que inyecta la sangre, la bomba del cromatógrafo inyecta la fase o fases móviles a un flujo y presión constante. Este flujo y presión varían de acuerdo con el método a desarrollar. En general el funcionamiento de la bomba es: aspirar la fase móvil y hacerla pasar por el sistema, posteriormente por la columna y finalmente por detector, para ser desechado en el contenedor de desechos, o en el caso de cromatografía preparativa, recuperar las fracciones de interés.
- Inyector: este puede ser de inyección manual o un sistema automatizado de inyección. Debe ser capaz de inyectar la muestra líquida en un rango específico de volúmenes con alta reproducibilidad y bajo alta presiones, mismas que maneja la bomba. Usualmente el inyector ya sea manual o automático, tiene dos posiciones de inyecciones "load" o carga es cuando la muestra se introduce, a una presión atmosférica en el "loop" un compartimiento con una capacidad específica de volumen, y la posición de inyección, en la cual el flujo de fase móvil, a la presión que lleva la bomba, se hace pasar por el loop, acarreando la muestra directamente a la columna.
- Columna: son cilindros de acero inoxidable, de una longitud variable entre 50 y 300 mm, con un diámetro interno de 2 hasta 5 mm, por dentro tienen empaquetada la fase estacionaria, que son partículas de un tamaño entre 1.7 y 10 μm . Es considerada por algunos autores como el corazón del cromatógrafo, ya que su interacción con el analito es lo que define la separación. El empaquetamiento de la fase estacionaria, y el tamaño de partícula tan pequeño es lo que causa altas presiones en el sistema, y, por ende, el nombre de "high pressure". Como ya se explicó anteriormente, dependiendo del tipo de cromatografía, es la naturaleza fisicoquímica de la fase estacionaria.

- Detector: situado al final de la columna, es el encargado de distinguir los analitos después de eluir por la columna. Regularmente son usados los detectores de espectroscopia UV que pueden ser: de longitud de onda fija, longitud de onda variable o bien de arreglo de diodos. Menos comunes los de espectrometría de masas y los de fluorescencia, entre otros. El detector puede ver las moléculas conforme eluyen de la columna permitiendo el análisis cuantitativo después de la separación. El detector más usado en cromatografía de líquidos es el detector de espectroscopia UV, en su versión de arreglo de diodos, este detector permite determinar la pureza de pico por comparación de los espectros de absorción de estándares que se comparan con las muestras. La desventaja más importante de los detectores UV es que los compuestos que carecen de grupos cromóforos no son viables de ser detectados en este sistema.
- Computadora: esta permite mediante un software acoplado al sistema cromatográfico, transmitir instrucciones, recolectar señales, transformar e interpretar los datos, mostrar los datos al analista (Husen, 2022; Sadaphal y Dhamak 2022).

METODOLOGÍA

Materiales, reactivos, equipos e instrumentos:

- Balanza analítica Sartorius
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu
 - Bomba isocrática LC-10AD VP
 - Autoinyector Shimadzu SIL-10A
 - Detector UV-Vis Shimadzu SPD-10 A VP
 - Controlador Shimadzu SCL-10 A VP
 - Software LabSolution
- Columnas: Agilent Eclipse Plus C8, 3.5 μm , 4.6 x 150mm; Agilent Zorbax DB C18, 3.5 μm , 4.6x150mm; y Agilent Zorbax DB C18, 3.5 μm , 4.6x150mm
- Sonicador
- Sistema de filtración de solventes Millipore (con membrana de nylon 0.45 μm)
- Equipo de purificación de agua MilliQ
- Potenciómetro Hanna modelo HI 211
- Viales para equipo cromatográfico de 1.5 mL
- Insertos para vial de cromatografía de 250 μL
- Parrilla de calentamiento y agitación
- Matraces volumétricos (5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 y 1000 mL)
- Probetas (10, 50, 100, 500 y 1000 mL)
- Vasos de precipitado (50, 100 y 200 mL)
- Botellas graduadas (50, 100, 250, 400, 1000 y 2000 mL)
- Celdas de cuarzo para espectrofotómetro
- Tubos de ensayo con rosca y tapón
- Tubos Cornell de 20 mL
- Gradilla para tubos de ensayo
- Micropipetas con puntas intercambiables de plástico
- Pipeta de repetición Eppendorf con puntas intercambiables

- Microtubos de 2 mL
- Pisleta de plástico
- Pipetas Pasteur
- Papel aluminio

Reactivos:

- Metanol grado HPLC
- Agua desionizada
- Agua destilada
- Fosfato monobásico de sodio
- Fosfato dibásico de sodio
- Solución salina de Hank

Estándares

- Estándar de acetaminofén
- Estándar de ranitidina
- Estándar de Casiopeína III-Ea

Preparación de soluciones

Soluciones Stock y de trabajo:

- Solución stock de acetaminofén (1000 µg/mL)

Se pesaron 0.010 g de estándar de acetaminofén, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó al aforo con una solución de metanol: agua (80:20).

- Solución de trabajo de acetaminofén (400 µg/mL)

Se midieron 4 mL de la solución stock de acetaminofén 1000 µg/mL, y se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL, finalmente se llevó al aforo con solución de metanol: agua

- Solución stock de ranitidina en solución salina de Hank (100 µg/mL)

Se pesaron 0.005 g de clorhidrato de ranitidina y se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL llevando al aforo con solución salina de Hank.

- Solución stock de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank (1000 µg/mL)

Se pesó el equivalente a 0.005 g de Casiopeína III-Ea y se transfirieron a un matraz volumétrico de 5 mL llevando al aforo con solución salina de Hank.

- Solución de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank (20 µg/mL)

Se tomaron 20 µL de solución Stock de Casiopeína III-Ea (1000 µg/mL) y se llevaron a 1 mL con solución salina de Hank.

- Solución de trabajo de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank (10 µg/mL)

Se tomaron 500 µL de solución Stock de Casiopeína III-Ea (20 µg/mL) y se llevaron a 1 mL con solución salina de Hank.

- Solución stock de propranolol en solución salina de Hank (1000 µg/mL)

Se pesaron 0.005 g de clorhidrato de propranolol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 5 mL llevando al aforo con solución salina de Hank.

- Solución de trabajo de propranolol en solución salina de Hank (100 µg/mL)

Se tomó 1 mL de la solución de clorhidrato de propranolol 1000 µg/mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL llevando al aforo con solución salina de Hank.

Buffer o soluciones amortiguadoras

- Solución de fosfato monobásico de sodio 1 M

Se pesaron 1.3799 g de fosfato monobásico de sodio, y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL llevando al aforo con agua desionizada.

- Solución de fosfato dibásico de sodio 0.05 M

Se pesaron 7.098 g de fosfato dibásico de sodio y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL llevando al aforo con agua desionizada.

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 7.6)

Se midieron 5.2 mL de solución de fosfato monobásico de sodio 1 M y 63.2 mL de fosfato dibásico de sodio 0.05 M, se transfirieron a un matraz volumétrico de 1000 mL, se ajustó el pH usando una solución de ácido fosfórico o hidróxido de sodio y se llevó al aforo con agua desionizada.

Fases móviles y de lavado:

- Fase móvil metanol: solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 7.6) (60:40)

Se midieron 600 mL de metanol grado HPLC y 400 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 7.6), se transfirieron a una botella de vidrio, posteriormente se realizó una filtración usando el equipo Millipore con una membrana de nylon de 0.45 μm y se desgasificó la solución mediante ultrasonido por 45 minutos.

- Fase móvil metanol: solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 7.6) (30:70)

Se midieron 300 mL de metanol grado HPLC y 700 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 7.6), se transfirieron a una botella de vidrio, posteriormente se realizó una filtración usando el equipo Millipore con una membrana de nylon de 0.45 μm y se desgasificó la solución mediante ultrasonido por 45 minutos.

- Fase móvil metanol: solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 7.6) (70:30)

Se midieron 700 mL de metanol grado HPLC y 300 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 7.6), se transfirieron a una botella de vidrio, posteriormente se realizó una filtración usando el equipo Millipore con una membrana de nylon de 0.45 μm y se desgasificó la solución mediante ultrasonido por 45 minutos.

- Fase de lavado para cromatógrafo y columna, metanol: agua (50:50)

Se midieron 250 mL de metanol grado HPLC y 250 mL de agua desionizada, se transfirieron a una botella de vidrio, posteriormente se realizó una filtración usando el equipo Millipore con una membrana de nylon de 0.45 μm y se desgasificó la solución mediante ultrasonido por 45 minutos.

Procedimiento experimental:

Determinación de acetaminofén por espectrofotometría UV-Vis

En un día se preparó una curva de calibración de acetaminofén tomando las siguientes alícuotas a partir de la solución de trabajo:

Tabla 1. Curva de calibración de acetaminofén

Solución	Concentración (µg/mL)	µL de sol. De Trabajo	Aforo (mL)
1	16	400	10
2	20	500	
3	25	625	
4	32	800	
5	40	1000	

Una vez preparadas las soluciones se llevó la solución de 16 µg/mL a realizar un barrido en el espectrofotómetro, el valor de absorbancia máxima obtenido se utilizó para medir las demás soluciones.

De igual forma, para medir la variabilidad del analista, en un día distinto se preparó la curva por triplicado a partir de la misma solución stock, obteniendo el valor de absorbancia de cada solución y se calculó el coeficiente de variación.

Validación parcial del método de cuantificación de Casiopeína III-Ea, clorhidrato de ranitidina y clorhidrato de propranolol en solución salina de Hank

Se usaron las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol

Condiciones	Casiopeína III-Ea	Ranitidina	Propranolol
Columna:	Agilent Eclipse Plus C8, 3.5 µm, 4.6 x 150mm	Agilent Zorbax DB C18, 3.5 µm, 4.6x150mm	Agilent Zorbax DB C18, 3.5 µm, 4.6x150mm
Fase móvil:	Metanol : buffer fosfatos (pH 7.6) (30:70)	Metanol : buffer fosfatos (pH 7.6) (60:40)	Metanol : buffer fosfatos (pH 7.6) (70:30)
Velocidad de flujo:	0.8 mL/min	0.8 mL/min	0.8 mL/min
Longitud de onda	273 nm	290 nm	322 nm
Temperatura:	Ambiente	Ambiente	Ambiente
Volumen de inyección:	50µL	25 µL	25 µL
Tiempo de corrida:	15 min	5 min	11 min
tR:	4±1 min	3±1 min	8±1 min
Datos usados para integrar	Área (mV)	Área (mV)	Área (mV)

Linealidad:

En un solo día se corrió por triplicado la curva de calibración de Casiopeína III-Ea (Tabla 3), ranitidina (Tabla 4) y propranolol (Tabla 5) en solución salina de Hank.

Tabla 3. Curva de calibración de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank

Solución	Concentración (µg/mL)	µL de Stock	Aforo (mL)
1	1.25	500 µL a partir de solución 2	1
2	2.5	500 µL a partir de solución 3	1
3	5	500 µL a partir de solución 4	1
4	10	500 µL a partir de solución 5	1
5	20	20 µL a partir del Stock	1
Adecuabilidad	20	20 µL a partir del Stock	1

Tabla 4. Curva de calibración de clorhidrato de ranitidina en solución salina de Hank

Solución	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	μL de Stock	Aforo (mL)
1	0.5	25	5
2	4	200	5
3	6	300	5
4	8	400	5
5	10	500	5
6	18	900	5
Adecuabilidad	8	400	5

Tabla 5. Curva de calibración de clorhidrato de propranolol en solución salina de Hank

Sol	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	μL de Sol. De trabajo	Aforo (mL)
1	0.5	5	1
2	1	10	1
3	5	50	1
4	8	80	1
5	10	100	1
6	15	150	1
7	20	200	1
Adecuabilidad	8	80	1

En cada corrida se inyectó por quintuplicado la solución de adecuabilidad del sistema cromatográfico.

Una vez preparadas las soluciones se tomaron 1500 μL de las soluciones de clorhidrato de ranitidina y se transfirieron a un vial para su inyección al cromatógrafo. Por otro lado, para las soluciones de Casiopeína III-Ea y clorhidrato de propranolol se tomaron 250 μL de las soluciones y se transfirieron a un inserto dentro de un vial para su inyección al cromatógrafo.

Precisión:

Se evaluó repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad:

Para cada compuesto se prepararon en un día diferente por sextuplicado los puntos control bajo, medio y alto, de forma independiente para cada curva de calibración de Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol (Tablas 6, 7 y 8 respectivamente).

Tabla 6. Muestras control de Casiopeína III-Ea

Muestra	Concentración (µg/mL)	Alícuota (µL)	Aforo (mL)
MCB	2	200 µL a partir de solución de trabajo	1
MCM	8	8 µL a partir de Stock	1
MCA	15	15 µL a partir de Stock	1

Tabla 7. Muestras control de clorhidrato de ranitidina

Muestra	Concentración (µg/mL)	µL de Stock	Aforo (mL)
MCB	1	10	1
MCM	9	90	1
MCA	17	170	1

Tabla 8. Muestras control de clorhidrato de propranolol

Muestra	Concentración (µg/mL)	µL de Sol. Trab.	Aforo (mL)
MCB	2	20	1
MCM	9	90	1

MCA | 19 | 190 | 1

Reproducibilidad:

Para cada compuesto se prepararon en dos días distintos bajo las mismas condiciones experimentales los puntos control bajo, medio y alto por sextuplicado.

Exactitud:

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación absoluta de la concentración obtenida respecto a la concentración nominal usando la ecuación:

$$\% \text{ Desviación} = 100 \times \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración nominal}}$$

Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se usó Excel 365 y los software SigmaPlot y GraphPad.

ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante la estancia en el servicio social se realizaron las siguientes actividades:

- Inventario de reactivos sólidos, líquidos y estándares en el laboratorio 113 del Conjunto E
- Determinación de acetaminofén por método de espectroscopia UV-vis
- Capacitación en el uso del cromatógrafo, preparación de fases móviles, fases de lavado, lavado de columnas y equipo, instalación de columnas y precolumnas, cambio de los cartuchos de la precolumna, limpieza exhaustiva de material para cromatografía.
- Preparación, uso y almacenamiento de soluciones volumétricas: ácidos, bases, buffers, etc.
- Preparación y almacenamiento de muestras para validación parcial.
- Preparación y almacenamiento de muestras para estudio de permeabilidad.
- Puesta en marcha de corridas analíticas en el cromatógrafo para la validación parcial y para estudios de permeabilidad.
- Análisis de datos de estudio de permeabilidad.

METAS ALCANZADAS

Debido al confinamiento por la COVID 19 en los años 2020, 2021 y 2022 el acceso a los laboratorios en la UAM Xochimilco se vio restringido, por lo tanto, los conocimientos prácticos en algunas áreas fueron omitidos. Durante el servicio social prestado en el Laboratorio 113 del Conjunto E de la Facultad de Química se logró recuperar el conocimiento en manejo de equipo e instrumentación en el área de química analítica y validación. A pesar de los contratiempos y los errores tanto sistemáticos como aleatorios, la validación parcial tuvo muy buenos resultados, cumpliendo con los objetivos planteados.

RESULTADOS

- Determinación de acetaminofén por espectrofotometría UV-Vis

La solución de 16 $\mu\text{g/mL}$ de acetaminofén se llevó a realizar un barrido en el espectrofotómetro en un rango de longitudes de onda entre 200 y 400 nm. Como se puede observar en la Figura 2, la solución mostró una absorción máxima a los 244 nm, longitud que se usó para obtener las absorbancias en las demás soluciones.

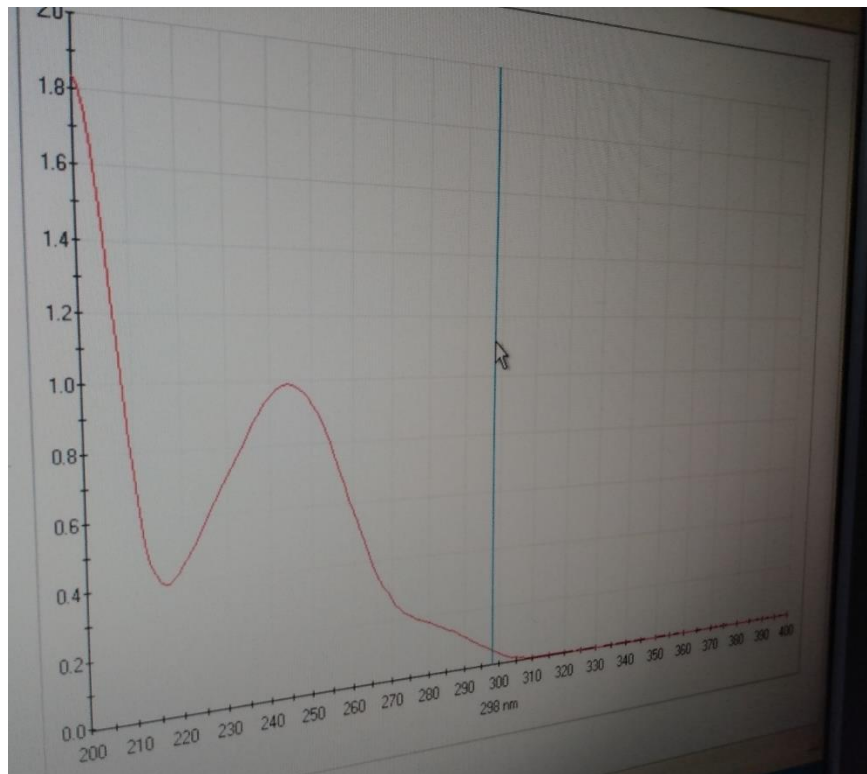


Figura 2. Barrido de la solución de acetaminofén (16 $\mu\text{g/mL}$)

Como se puede observar en la Tabla 9 y en la Figura 3, en el día 1, se obtuvo buena linealidad, con un coeficiente de correlación de 0.9944.

Tabla 9. Absorbancias obtenidas de la curva de calibración de acetaminofén

Solución	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
1	16	0.947

2	20	1.191
3	25	1.498
4	32	1.877
5	40	2.222

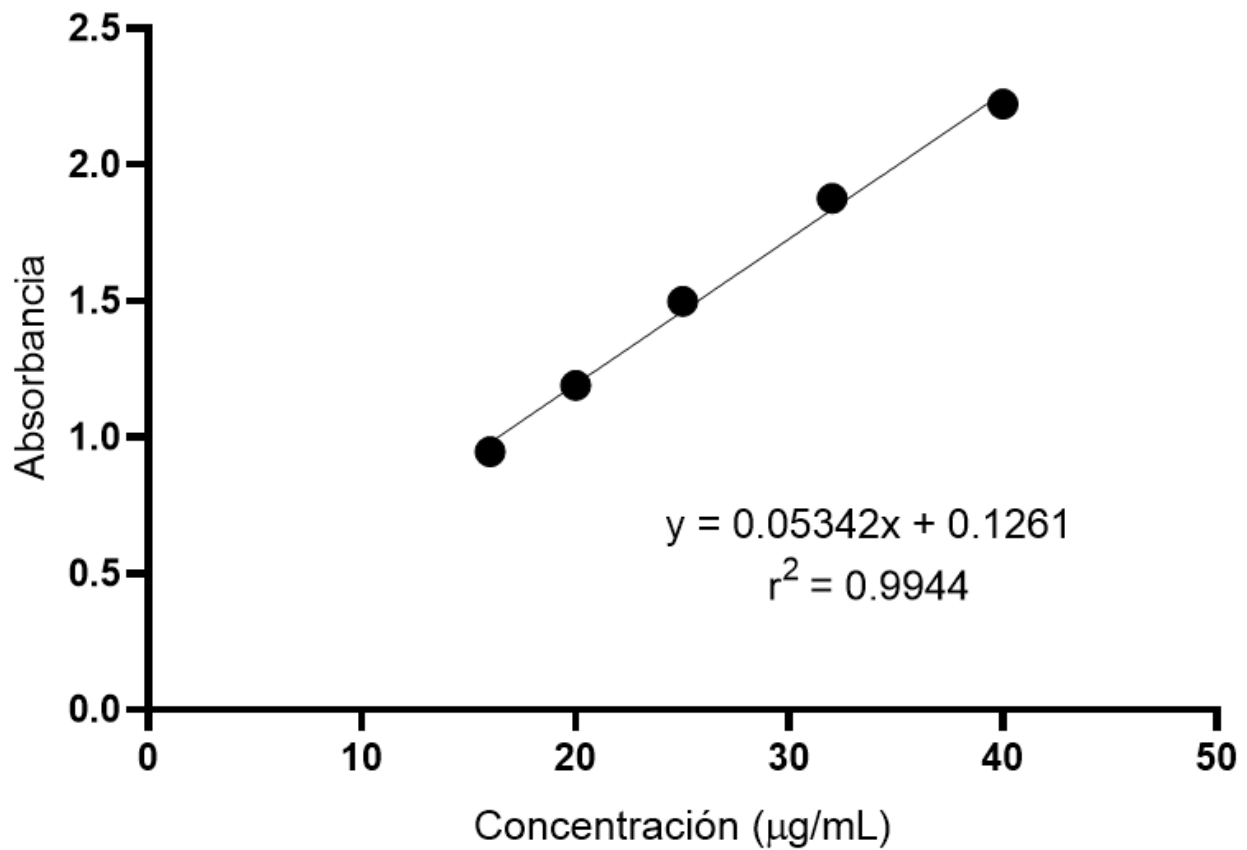


Figura 3. Curva de calibración de acetaminofén

Posteriormente, en un día distinto, se prepararon tres curvas de calibración a partir de una solución stock (100 µg/mL) para evaluar la variación del analista, como se puede observar en la Tabla 10, el coeficiente de variación no supera el 2% en la mayoría de las concentraciones a excepción del segundo punto.

Tabla 10. Resultados de variabilidad del analista con acetaminofén

Solución	Concentración (µg/mL)	Absorbancia media	Desviación estándar	CV %	EE
1	16	0.998	0.015	1.513	0.009
2	20	1.252	0.061	4.903	0.035
3	25	1.524	0.026	1.676	0.015
4	32	1.924	0.015	0.766	0.009
5	40	2.416	0.009	0.385	0.005

(n = 3)

- Validación parcial del método de cuantificación de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank

Selectividad

No se presentaron interferencias de la matriz para cuantificar el analito de interés (Casiopeína III-Ea), se presenta un cromatograma del blanco (solución salina de Hank) y Casiopeína III-Ea en solución de Hank (Figura 4: a y b).

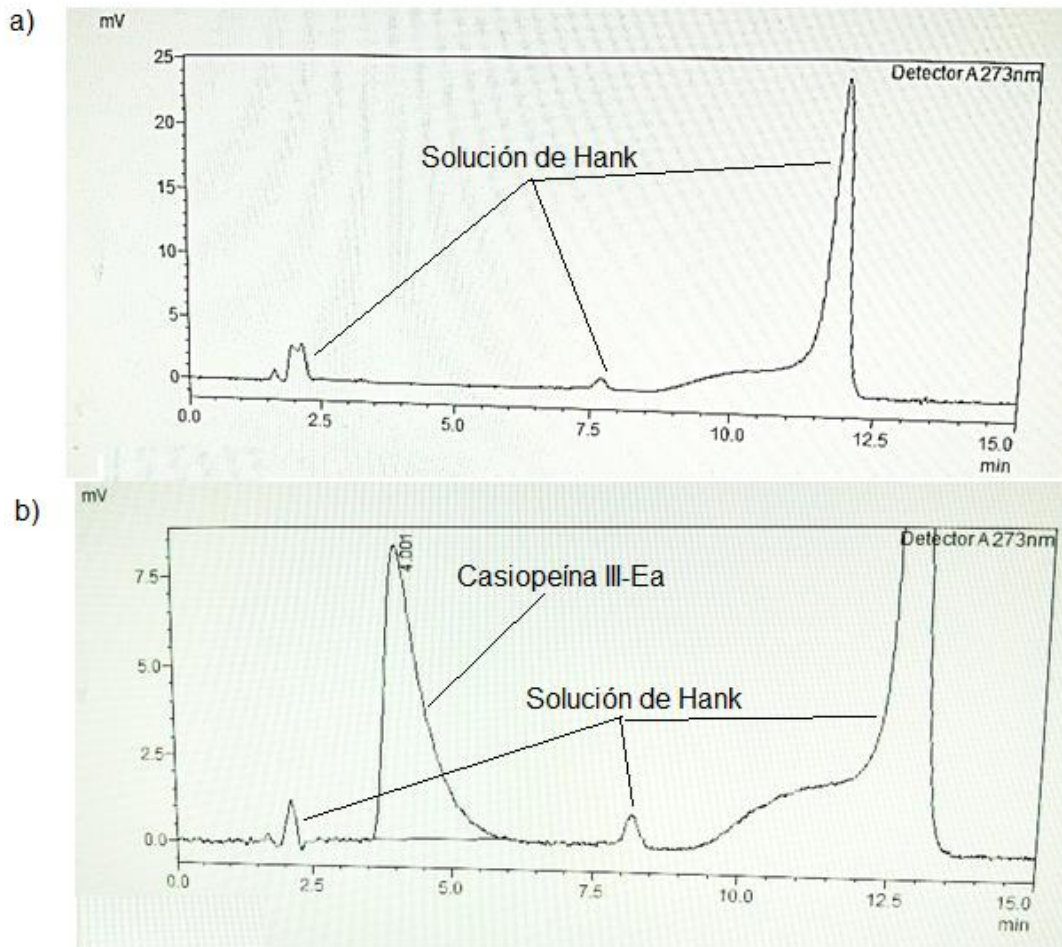


Figura 4. Cromatogramas de selectividad de Casiopeína III-Ea a una longitud de onda de 273 nm. a) Solución salina de Hank, b) Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank

Linealidad

En la Tabla 11 se muestran los valores de coeficiente de variación en cada uno de los puntos de la curva de calibración. En la figura 5 se presenta el gráfico y la ecuación de la recta junto al coeficiente de correlación, el cual tiene un valor de 0.9971.

Tabla 11. Resultados de linealidad de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank

Conc. Nominal (µg/mL)	Réplica 1 Área (mV)	Réplica 2 Área (mV)	Réplica 3 Área (mV)	Promedio	SD	CV%
1.25	13628	13385	13618	13543.7	137.5	1.0
2.5	30012	30660	30332	30334.7	324.0	1.1
5	76229	76899	76506	76544.7	336.7	0.4
10	153040	156462	155753	155085.0	1806.2	1.2
20	378902	374022	372477	375133.7	3353.7	0.9
r	0.9964	0.9975	0.9975	0.9971		
m	19484.4	19244.6	19161.9	19296.9		
b	-20641.6	-18860.0	-18767.3	-19423.0		

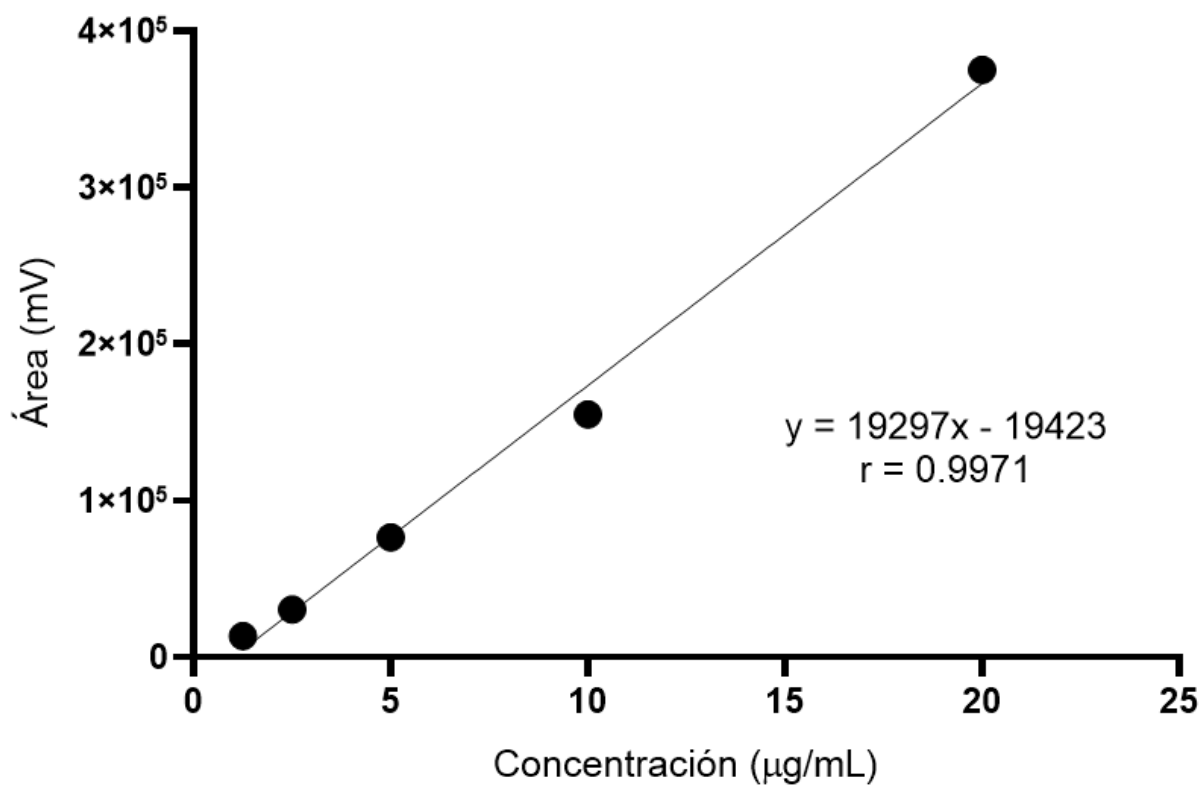


Figura 5. Curva de calibración de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank

Precisión:

Repetibilidad:

Los resultados de la inyección de las muestras control preparadas por sextuplicado en dos días distintos se muestran en la Tabla 12 y 13, se destaca que el coeficiente de variación en ambos días y en cada uno de los puntos es menor a 15%.

Tabla 12. Resultados de repetibilidad (día 1) de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank

Muestra	MCB (2 µg/mL)		MCM (8 µg/mL)		MCA (15 µg/mL)	
	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA
1	1.94	3.06	8.57	6.63	14.51	3.27
2	1.97	1.61	9.18	12.88	14.54	3.06
3	2.04	2.13	7.80	2.54	15.02	0.14
4	2.05	2.68	8.08	1.05	14.23	5.11
5	1.91	4.47	8.09	1.11	14.22	5.23
6	2.10	5.14	8.29	3.62	14.73	1.81
Promedio	2.00	3.21	8.33	4.64	14.54	3.10
SD	0.07		0.49		0.31	
CV%	3.73		5.85		2.10	

Tabla 13. Resultados de repetibilidad (día 2) de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank

Muestra	MCB (2 µg/mL)		MCM (8 µg/mL)		MCA (15 µg/mL)	
	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA
1	1.65	17.65	9.05	13.15	14.94	0.41
2	1.71	14.38	8.34	4.20	12.77	14.84
3	1.85	7.34	9.08	13.52	14.58	2.83
4	1.72	13.86	8.64	7.99	14.60	2.66
5	2.06	2.82	8.06	0.80	15.92	6.13
6	1.93	3.71	7.52	5.95	13.67	8.84
PROMEDIO	1.82	9.96	8.45	7.60	14.41	5.95
SD	0.15		0.60		1.08	
CV%	8.48		7.14		7.50	

Reproducibilidad:

Los resultados de la preparación en dos días diferentes de los puntos control preparados por sextuplicado se presentan en la tabla 14, se observa que en ambos días el coeficiente de variación no excede el 15%.

Tabla 14. Resultados de reproducibilidad de Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank

	Muestra	MCB (2 µg/mL)		MCM (8 µg/mL)		MCA (15 µg/mL)	
		Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA
Día 1	1	1.94	3.06	8.57	6.63	14.51	3.27
	2	1.97	1.61	9.18	12.88	14.54	3.06
	3	2.04	2.13	7.80	2.54	15.02	0.14
	4	2.05	2.68	8.08	1.05	14.23	5.11
	5	1.91	4.47	8.09	1.11	14.22	5.23
	6	2.10	5.14	8.29	3.62	14.73	1.81
Día 2	1	1.65	17.65	9.05	13.15	14.94	0.41
	2	1.71	14.38	8.34	4.20	12.77	14.84
	3	1.85	7.34	9.08	13.52	14.58	2.83
	4	1.72	13.86	8.64	7.99	14.60	2.66
	5	2.06	2.82	8.06	0.80	15.92	6.13
	6	1.93	3.71	7.52	5.95	13.67	8.84
	Promedio	1.91	6.57	8.39	6.12	14.48	4.53
	SD	0.150		0.526		0.760	
	CV%	7.9		6.3		5.3	

Exactitud:

Se muestra el porcentaje de desviación absoluta promedio calculada en cada muestra control, en ambos días se observa que no supera el 15% (Tabla 14)

- Validación parcial del método de cuantificación de ranitidina en solución salina de Hank

Selectividad

No se presentaron interferencias de las matriz para cuantificar el analito de interés (clorhidrato de ranitidina), se presenta un cromatograma del blanco (solución salina de Hank) y clorhidrato de ranitidina en solución salina de Hank (Figura 6: a y b)

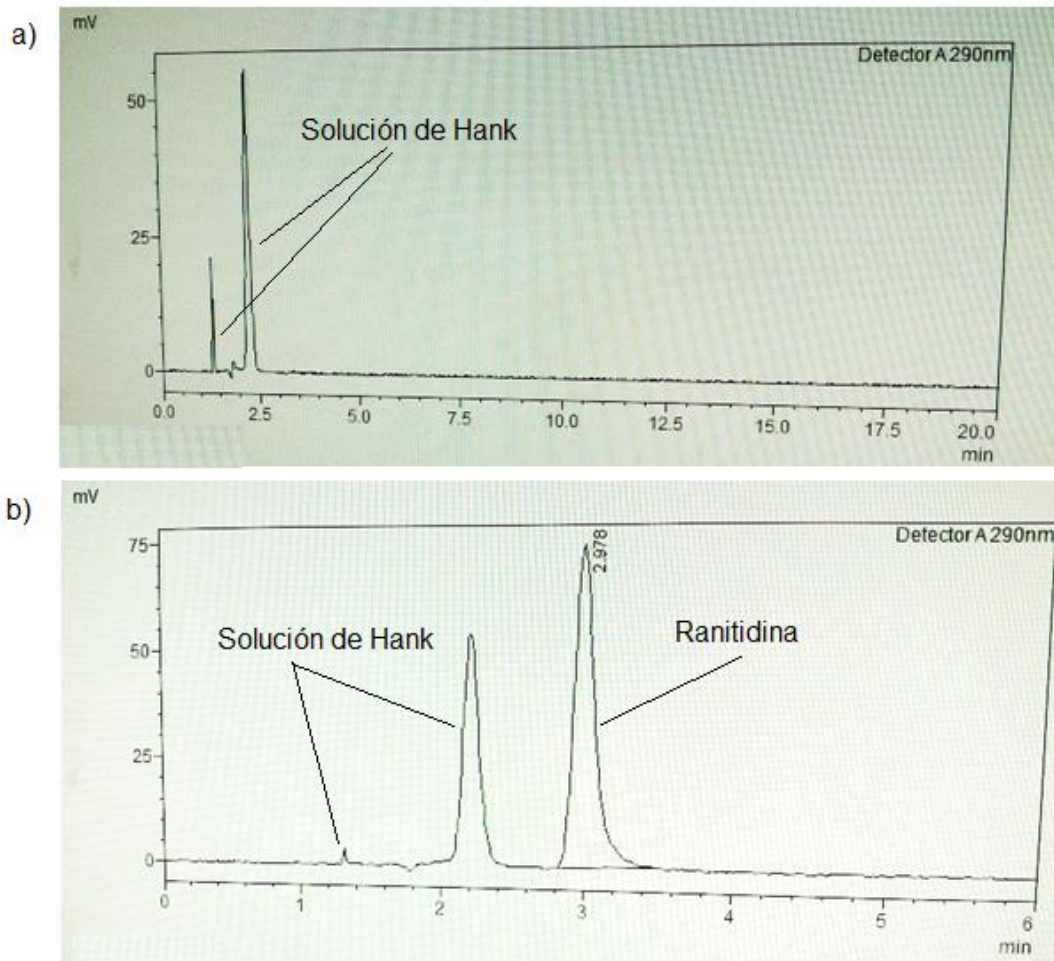


Figura 6. Cromatogramas de selectividad de ranitidina a una longitud de onda de 290 nm. a) Solución salina de Hank, b) Clorhidrato de ranitidina en solución salina de Hank

Linealidad

En la Tabla 15 se muestran los valores de coeficiente de variación en cada uno de los puntos de la curva, destacando el punto número 2 con un valor ligeramente alto. En la

figura 7 se presenta la gráfica y la ecuación de la recta junto al coeficiente de correlación, el cual tiene un valor de 0.9997.

Tabla 15. Resultados de linealidad de ranitidina en solución salina de Hank

Conc. Nominal (µg/mL)	Réplica 1 Área (mV)	Réplica 2 Área (mV)	Réplica 3 Área (mV)	Promedio	SD	CV%
0.55	19185	19572	20235	19664.00	531.01	2.70
4.4	150614	174735	184286	169878.33	17353.42	10.22
6.6	238647	260282	262415	253781.33	13150.04	5.18
8.8	312132	358580	339374	336695.33	23339.57	6.93
11	421142	429395	427296	425944.33	4289.32	1.01
19.8	731740	751241	727742	736907.67	12572.96	1.71
r	0.9992	0.9993	0.9990	0.9997		
m	37422.01	37922.08	36432.43	37258.84		
b	-6779.26	9015.11	16304.83	6180.23		

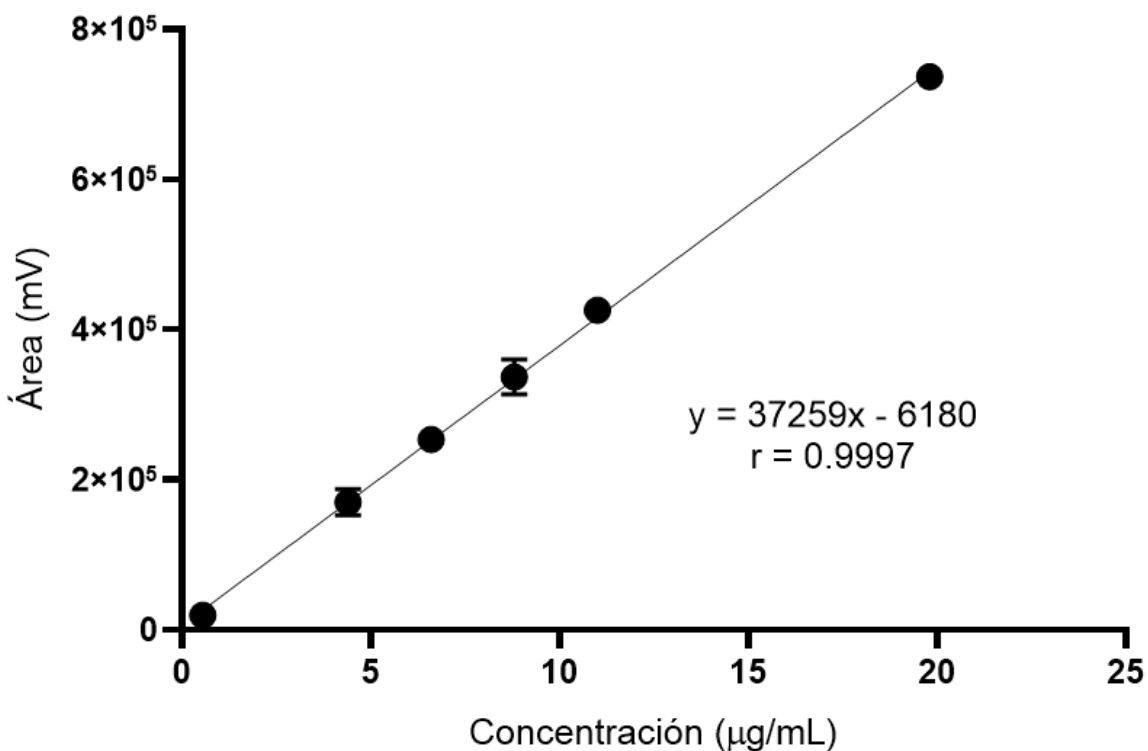


Figura 7. Curva de calibración de ranitidina en solución salina de Hank

Precisión:

Repetibilidad:

Los resultados de la inyección de las muestras control preparadas por sextuplicado en dos días distintos se muestran en la Tabla 10 y 11, se destaca que el coeficiente de variación en ambos días y en cada uno de los puntos es menor al 15%.

Tabla 16. Resultados de repetibilidad (día 1) de ranitidina en solución salina de Hank

Muestra	MCB (1 µg/mL)		MCM (9 µg/mL)		MCA (17 µg/mL)	
	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA
1	0.92	8.03	8.45	6.09	16.97	0.16
2	1.03	3.37	8.53	5.19	16.82	1.06
3	1.01	1.14	8.22	8.65	17.15	0.87
4	1.00	0.20	8.44	6.27	15.40	9.43
5	1.02	1.81	8.81	2.12	16.97	0.17
6	1.02	1.98	8.16	9.29	16.89	0.67
Promedio	1.00	2.76	8.44	6.27	16.70	2.06
SD	0.04		0.23		0.65	
CV%	4.11		2.75		3.88	

Tabla 17. Resultados de repetibilidad (día 2) de ranitidina en solución salina de Hank

Muestra	MCB (1 µg/mL)		MCM (9 µg/mL)		MCA (17 µg/mL)	
	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA
1	0.88	12.48	8.26	8.19	16.19	4.77
2	0.87	12.91	8.39	6.74	16.26	4.36
3	0.89	11.26	8.51	5.46	13.88	18.36
4	0.88	12.19	8.26	8.27	15.84	6.80
5	0.90	10.02	8.27	8.13	15.76	7.29
6	0.85	14.72	8.49	5.69	15.94	6.26
Promedio	0.88	12.26	8.36	7.08	15.64	7.97
SD	0.02		0.12		0.89	
CV%	1.81		1.40		5.66	

Reproducibilidad:

Los resultados de la preparación en dos días diferentes de los puntos control preparados por sextuplicado se presentan en la Tabla 18, se observa que en ambos días el coeficiente de variación no excede el 15%.

Tabla 18. Resultados de reproducibilidad ranitidina en solución salina de Hank

	Muestra	MCB (1 µg/mL)		MCM (9 µg/mL)		MCA (17 µg/mL)	
		Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA
Día 1	1	0.92	8.03	8.45	6.09	16.97	0.16
	2	1.03	3.37	8.53	5.19	16.82	1.06
	3	1.01	1.14	8.22	8.65	17.15	0.87
	4	1.00	0.20	8.44	6.27	15.40	9.43
	5	1.02	1.81	8.81	2.12	16.97	0.17
	6	1.02	1.98	8.16	9.29	16.89	0.67
Día 2	1	0.88	12.48	8.26	8.19	16.19	4.77
	2	0.87	12.91	8.39	6.74	16.26	4.36
	3	0.89	11.26	8.51	5.46	13.88	18.36
	4	0.88	12.19	8.26	8.27	15.84	6.80
	5	0.90	10.02	8.27	8.13	15.76	7.29
	6	0.85	14.72	8.49	5.69	15.94	6.26
	Promedio	0.94	7.51	8.40	6.67	16.17	5.02
	SD	0.071		0.179		0.922	
	CV%	7.5		2.1		5.7	

Exactitud:

Se muestra el porcentaje de desviación promedio calculado en cada muestra control, en ambos días se observa que no supera el 15% (Tabla 18)

- Validación parcial del método de cuantificación de propranolol en solución salina de Hank

Selectividad

No se presentaron interferencias de la matriz para cuantificar el analito de interés (clorhidrato de propranolol), se presenta un cromatograma del blanco (solución salina de Hank) y clorhidrato de propranolol en solución de Hank (Figura 8: a y b)

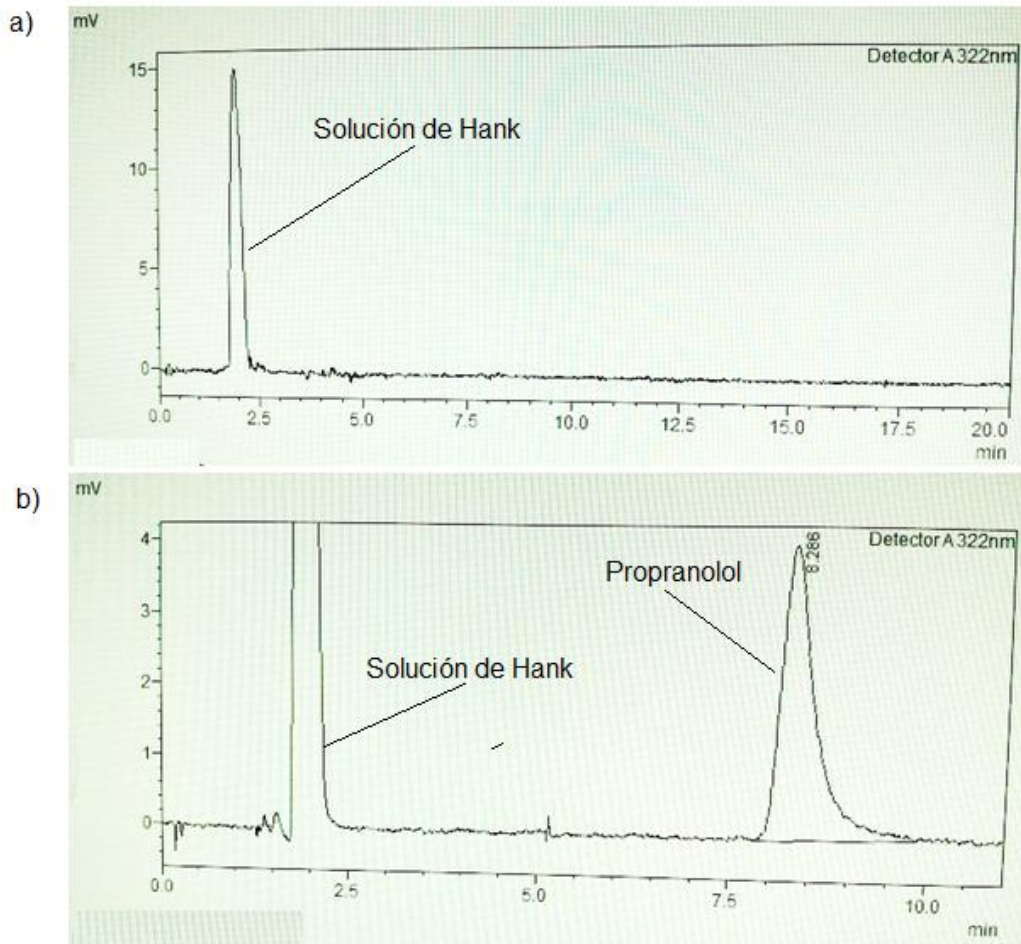


Figura 8. Cromatogramas de selectividad de propranolol a una longitud de onda de 322 nm. a) Solución salina de Hank, b) Propranolol en solución salina de Hank

Linealidad

En la Tabla 19 se muestran los valores de coeficiente de variación en cada uno de los puntos de la curva, destacando el último punto con coeficiente ligeramente más alto. En la figura 9 se presenta la gráfica y la ecuación de la recta junto al coeficiente de correlación, el cual tiene un valor de 0.998.

Tabla 19. Resultados de linealidad de propranolol en solución salina de Hank

Conc. Nominal (µg/mL)	Réplica 1 Área (mV)	Réplica 2 Área (mV)	Réplica 3 Área (mV)	Promedio	SD	CV%
0.5	4546	4329	4617	4497.33	150.04	3.34
1	6276	6109	6385	6256.67	139.01	2.22
5	26232	27811	27499	27180.67	836.25	3.08
8	46702	44340	46744	45928.67	1375.99	3.00
10	58009	57437	58248	57898.00	416.74	0.72
15	92951	91523	90053	91509.00	1449.05	1.58
20	120025	128577	109614	119405.33	9496.67	7.95
r	0.999	0.997	0.998	0.9980		
m	6051.31	6331.93	5585.90	5989.71		
b	-758.88	-2374.84	1542.72	-530.33		

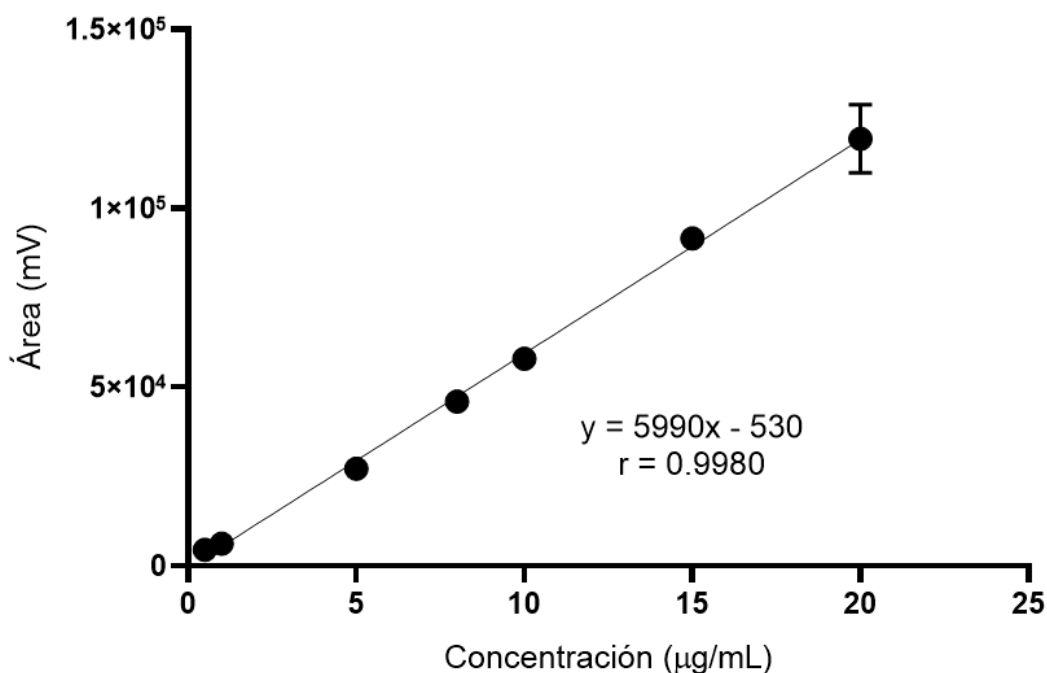


Figura 9. Curva de calibración de propranolol en solución salina de Hank

Repetibilidad:

Los resultados de la inyección de las muestras control preparadas por sextuplicado en dos días distintos se muestran en la Tabla 20, se destaca que el coeficiente de variación en cada uno de los puntos es menor al 15%.

Tabla 20. Resultados de repetibilidad (día 1) de propranolol en solución salina de Hank

Muestra	MCB (2 µg/mL)		MCM (9 µg/mL)		MCA (19 µg/mL)	
	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA
1	1.95	2.52	9.25	2.70	18.79	1.11
2	1.92	4.23	10.19	11.68	20.35	7.09
3	1.88	5.85	9.01	0.06	19.30	1.59
4	1.96	1.91	9.16	1.78	19.48	2.51
5	2.01	0.42	9.26	2.80	18.92	0.41
6	1.92	4.00	9.87	8.85	19.14	0.73
Promedio	1.94	3.28	9.46	4.65	19.33	2.24
SD	0.04		0.47		0.56	
CV%	2.25		4.92		2.88	

Tabla 21. Resultados de repetibilidad (día 2) de propranolol en solución salina de Hank

Muestra	MCB (2 µg/mL)		MCM (9 µg/mL)		MCA (19 µg/mL)	
	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA
1	1.73	13.49	8.92	0.85	18.67	1.75
2	1.82	9.19	8.92	0.86	18.56	2.32
3	1.86	7.04	8.64	4.20	18.85	0.81
4	1.82	9.07	8.77	2.60	17.84	6.11
5	1.83	8.42	8.97	0.32	18.26	3.92
6	1.97	1.64	8.75	2.81	19.19	1.02
Promedio	1.84	7.07	8.83	1.94	18.56	2.65
SD	0.08		0.13		0.47	
CV%	4.19		1.47		2.54	

Reproducibilidad:

Los resultados de la preparación en dos días diferentes de los puntos control preparados por sextuplicado se presentan en la Tabla 22, se observa que en ambos días el coeficiente de variación no excede el 15%.

Tabla 22. Resultados de reproducibilidad de propranolol en solución salina de Hank

	Muestra	MCB (2 µg/mL)		MCM (9 µg/mL)		MCA (19 µg/mL)	
		Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA	Conc. Cal.	% DEA
Día 1	1	1.95	2.52	9.25	2.70	18.79	1.11
	2	1.92	4.23	10.19	11.68	20.35	7.09
	3	1.88	5.85	9.01	0.06	19.30	1.59
	4	1.96	1.91	9.16	1.78	19.48	2.51
	5	2.01	0.42	9.26	2.80	18.92	0.41
	6	1.92	4.00	9.87	8.85	19.14	0.73
Día 2	1	1.73	13.49	8.92	0.85	18.67	1.75
	2	1.82	9.19	8.92	0.86	18.56	2.32
	3	1.86	7.04	8.64	4.20	18.85	0.81
	4	1.82	9.07	8.77	2.60	17.84	6.11
	5	1.83	8.42	8.97	0.32	18.26	3.92
	6	1.97	1.64	8.75	2.81	19.19	1.02
	Promedio	1.89	5.65	9.14	3.29	18.94	2.45
	SD	0.080		0.462		0.635	
	CV%	4.2		5.0		3.4	

Exactitud:

Se muestra el porcentaje de desviación promedio calculado en cada muestra control, en ambos días se observa que no supera el 15% (Tabla 22)

Tabla 23. Resumen de la validación parcial

	Criterio de aceptación		Casiopeína III-Ea			Ranitidina			Propranolol		
Selectividad del método	No existen interferencias para cuantificar el compuesto		Sin interferencias			Sin interferencias			Sin interferencias		
Linealidad del método	$r \geq 0.99$; $CV \leq 15\%$ para cada nivel de concentración, a excepción del LIC $\leq 20\%$		$r = 0.9971$; $CV < 3\%$, LIC = 1.0%			$r = 0.9997$; $CV < 11\%$, LIC = 2.70%			$r = 0.9980$; $CV < 4\%$, LIC = 3.34%		
Intervalo			1.25 - 20 $\mu\text{g/mL}$			0.55 - 19.8 $\mu\text{g/mL}$			0.5 - 20 $\mu\text{g/mL}$		
Precisión			MCB	MCM	MCA	MCB	MCM	MCA	MCB	MCM	MCA
Repetibilidad	$CV\% \leq 15\%$	Día 1	CV = 3.73	CV = 5.85	CV = 2.10	CV = 4.11	CV = 2.75	CV = 3.88	CV = 2.25	CV = 4.92	CV = 2.88
	$CV\% \leq 15\%$	Día 2	CV = 8.48	CV = 7.14	CV = 7.5	CV = 1.81	CV = 1.4	CV = 5.66	CV = 4.19	CV = 1.47	CV = 2.54
Reproducibilidad	$CV\% \leq 15\%$		CV = 7.9	CV = 6.3	CV = 5.3	CV = 7.53	CV = 2.13	CV = 5.7	CV = 4.25	CV = 5.05	CV = 3.35
Exactitud	$\% \text{DEA} \leq 15\%$		6.57	6.12	4.53	7.51	6.67	5.02	5.65	3.29	2.45

DISCUSIÓN

La evaluación biofarmacéutica de los fármacos nuevos en investigación es una herramienta útil que permite conocer distintos parámetros del desempeño o comportamiento del compuesto activo dentro de un organismo vivo, desde su absorción, hasta su metabolismo, es decir, su farmacocinética. Es de suma importancia conocer estos parámetros y establecer con certeza los niveles en las concentraciones que resultan efectivos y los que pueden resultar tóxicos (Batchelor *et al.*, 2013). La administración oral es una de las vías más frecuentes utilizadas para los medicamentos y requiere que el compuesto atraviese de forma eficiente las membranas celulares. Cuando los fármacos tienen problemas para absorberse por la vía oral se deben buscar otro tipo de administración que le permita llegar al nivel circulatorio y distribuirse hasta su diana terapéutica (Kostewicz *et al.*, 2014).

Los estudios de permeabilidad *in vitro* permiten la predicción de la capacidad del fármaco para atravesar una capa celular similar al epitelio intestinal, cabe mencionar que esta capacidad depende principalmente del tamaño y estructura del fármaco en cuestión (Chen, *et al.*, 2018). La información obtenida en estos estudios se considera predictiva del comportamiento *in vivo*. Datos importantes como porcentaje, velocidad y mecanismo de absorción, así como el coeficiente de permeabilidad aparente, se pueden determinar en estos sistemas. No obstante, el realizar este tipo de estudios tiene sus limitantes, por ejemplo, el tipo de línea celular que se usa, como las células MDCK, que no tienen un origen humano, y lo que se obtiene es una aproximación al comportamiento en el cuerpo. Ante este tipo de eventualidades, la FDA y la USP recomiendan que cuando estos estudios se realicen, se haga en conjunto con otros fármacos, que funcionen como estándares de alta y baja permeabilidad, es decir, que atraviesen muy bien o muy mal las monocapas celulares, con el fin de obtener un aproximado de si el compuesto en investigación se acerca más a uno o a otro (U.S. Food and Drug Administration, 2021).

Desde su descubrimiento hasta la actualidad, las Casiopeínas se han presentado como un fármaco con bastas propiedades anticancerígenas, con buenas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (algunas de las cuales siguen en investigación);

Casiopeína III-Ea ha logrado destacar por su acción contra algunos tipos de cáncer, además, tanto sus análogos, III-gly, etc., como la misma Casiopeína III-Ea han demostrado grandes propiedades biofarmacéuticas en estudios *in vitro*, lo que promete buen comportamiento *in vivo* (Álvarez-Barrera, *et al.*, 2016; García-Ramos, *et al.*, 2017; Rufino-González, *et al.*, 2019).

El método validado en este trabajo será utilizado en un estudio de permeabilidad para Casiopeína III-Ea en el laboratorio 113 del Conjunto E de la Facultad de Química aplicando los lineamientos tanto nacionales como internacionales, desde la aplicación de estándares de alta y baja o mediana permeabilidad, los relacionados al método analítico para la cuantificación de los compuestos, como la validación de métodos analíticos y bioanalíticos para demostrar la confiabilidad de los mismos, para que permita al analista una adecuada interpretación del experimento.

En estudios de fármacos en desarrollo la información preclínica del compuesto es evaluada para su aprobación por órganos colegiados, legislaciones académicas, y autoridades regulatorias nacionales e internacionales, en todos sus detalles. Las organizaciones previamente mencionadas establecen una amplia gama de normas y reglamentos para regular la validación de estos métodos analíticos, no obstante, tanto el analista como el laboratorio en que se lleve a cabo los experimentos deciden qué normas adoptar, en función de los objetivos y alcances del ensayo, por lo que, surgen las validaciones parciales, que no abarcan todas las especificaciones pero que aseguran la confiabilidad del método usado (Secretaría de Salud, 2013).

Los tres compuestos evaluados en este proyecto usaron distintas condiciones cromatográficas como se puede observar en la Tabla 2, esto se debe a las características fisicoquímicas de cada molécula, además se logró observar que todos los compuestos mostraron un distinto tiempo de retención, lo que modificaba los tiempos de análisis. Este tiempo de corrida también fue distinto en cada compuesto debido a los picos presentes en el cromatograma (Figura 4, 6 y 8), que corresponden a compuestos propios de la matriz (solución salina de Hank) en distintas longitudes de onda; la solución de Hank, fue formulada originalmente en 1940 por el microbiólogo John Hanks, y es rica en iones bicarbonato, suele usarse como solución amortiguadora o buffer en cultivo celular ya que

mantiene un pH fisiológico óptimo para el crecimiento (*Balanced Salt Solutions*, s. f.), estos iones bicarbonato, junto a otros iones y compuestos (como el rojo de fenol) son los que se detectan a distintas longitudes de onda en el análisis cromatográfico.

No obstante, y aunque los métodos desarrollados presentan pobre simetría de pico para el compuesto de interés y se presentan picos que pertenecen a la matriz que podrían constituir interferencias en las determinaciones, los tres métodos demostraron ser selectivos para los compuestos evaluados, así mismo, la adecuabilidad del sistema tuvo un coeficiente de variación menor al 2%, lo que demuestra que el sistema se encuentra operando de forma eficaz y que tanto la fase estacionaria, así como la fase móvil son aceptables para el análisis.

Se encontró además que la relación entre las concentraciones y respuestas (áreas bajo la curva) obtenidas se mantuvo de forma lineal en los intervalos especificados en la Tabla 23. Todas las curvas de calibración de Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol (Figuras 5, 7 y 9, y Tablas 11, 15 y 19 respectivamente) demostraron linealidad, con un coeficiente de correlación mayor a 0.99, y, los coeficientes de variación entre cada repetición no excedieron el 15%, tal como lo exige la legislación (Secretaría de Salud, 2013; Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, 2002). De esta forma, una vez evaluada la linealidad en cada compuesto, se pudo proceder con las siguientes determinaciones, ya que, al saber que la curva de calibración es confiable, se puede usar para conocer concentraciones desconocidas en las corridas analíticas posteriores.

Como se mencionó anteriormente, la precisión permite detectar las variaciones que existen entre mediciones repetidas. Al ser evaluados en dos días distintos los puntos control bajo, medio y alto, los tres métodos demostraron que el método cumple con el criterio de precisión (repetibilidad) (Tablas 12, 13, 16, 17, 20 y 21), con un coeficiente de variación de las áreas bajo la curva de cada punto control menor al 15% (incluso menor al 10% en todos los casos), y de igual forma, demostró cumplir con criterios de reproducibilidad (Tablas 14, 18 y 22) con un coeficiente de variación menor al 10%; este parámetro tiene una gran importancia, ya que en estos ensayos se realizan determinaciones de concentraciones desconocidas en distintas ocasiones, por lo que se debe demostrar que en los análisis recurrentes no varían las respuestas del método.

Finalmente, los métodos para Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol demostraron exactitud, en todos los casos se obtuvieron desviaciones absolutas promedio menores al 10% (Tabla 14, 18, 22 y 23), es decir, mucho menor al declarado por la normatividad (15%), esto demuestra que el método detecta concentraciones con una alta cercanía a la concentración real, y por lo tanto, al igual que los parámetros anteriores, es de gran importancia ya que en el ensayo de permeabilidad se necesita conocer concentraciones exactas que hayan atravesado las membranas.

En un estudio similar se reportaron resultados similares usando Casiopeina III-ia, observando selectividad, linealidad, precisión y exactitud usando solución salina de hank como medio de disolución (Del Castillo-García, 2010). Además de acuerdo con lo reportado por Vara-Gama, *et al.* (2021), que al igual que en el presente estudio utilizaron Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank, obtuvo una validación exitosa. De igual forma, en el estudio realizado por Mares-Sánchez, (2013), tanto el clorhidrato de ranitidina como el clorhidrato de propranolol, en el mismo medio de disolución utilizado, obtuvieron valores aceptables en la validación del método analítico.

La importancia del uso de HPLC en la cuantificación de estos compuestos recae en su gran capacidad para detectar concentraciones bajas (de hasta nanogramos) de los compuestos, y, además, distinguirlas de otras sustancias presentes en la muestra. Este método tiene sus ventajas, en especial en el análisis de muestras complejas, ya que, en otros instrumentos, como el espectrofotómetro, las respuestas se ven afectadas por compuestos de la muestra.

CONCLUSIONES

Los estudios de permeabilidad permiten obtener una aproximación del comportamiento *in vivo* de los medicamentos a partir de modelos *in vitro*. No obstante, es importante realizar una validación a la metodología analítica para asegurar la confiabilidad del mismo; existen diversas normas y reglas, en el país, una de las más importantes es la NOM-177-SSA1-2013. En el presente estudio se realizó la validación parcial del método bioanalítico de tres fármacos, ranitidina, propranolol y Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank, obteniendo resultados que concuerdan con lo establecido por la normativa y que permiten afirmar que el método, en los tres casos, es selectivo, lineal, preciso y exacto; y que puede usarse para el estudio de permeabilidad, ya que se asegura su confiabilidad.

RECOMENDACIONES

- Realizar la validación del sistema para observar el comportamiento cromatográfico de los compuestos en diferente matriz.
- Evaluar la estabilidad analítica de las muestras, ya sea en ciclos de congelación – descongelación, en su manejo a temperatura ambiente, exposición a la luz, y en el automuestreador del cromatógrafo para los tres fármacos.
- Evaluar la robustez del método, cambiando las proporciones de las fases móviles, el pH, la longitud de la columna, e incluso cambiando de equipo cromatográfico, por ejemplo, uno con elución en gradiente.
- Realizar lavados exhaustivos al material que se utilice en el estudio, como viales o material de cristal.
- Lavar las columnas para eliminar residuos de las muestras, especialmente residuos de los compuestos a evaluar, estos lavados podrían hacerse en el siguiente orden: primero con metanol al 50% por 30 minutos, después con metanol al 100% por 30 minutos, y finalmente con metanol al 50% por 30 minutos.
- Realizar mantenimiento preventivo y/o correctivo al equipo cromatográfico para evitar posibles fallos durante las corridas analíticas.
- Mantener en todo momento la temperatura ambiente tanto para la fase móvil como para la columna para evitar cambios en el tiempo de retención de los compuestos, y, por ende, conservar la reproducibilidad.
- Evaluar la calidad, estado y eficacia de las columnas cromatográficas usando parámetros como el número de platos teóricos o el factor de Coleo.

REFERENCIAS

- Adel, E. I., Magda, E., Hanaa, S. & Mahmoud, M. S. (2021). Overview on liquid chromatography and its greener chemistry application. *Annals of Advances in Chemistry*, 5(1), 004-012. <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001023>
- Álvarez-Barrera, L., Rodríguez-Mercado, J. J., López-Chaparro, M. & Altamirano-Lozano, M. A. (2016). Genotoxicity of Casiopeina III-Ea in mouse bone marrow cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(3), 333-338. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1229787>
- Balanced Salt Solutions*. (s. f.). Thermo Fisher Scientific - IE. Recuperado 15 de mayo de 2023, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/balanced-salt-solutions.html>
- Batchelor, H., Kendall, R., Desset-Brethes, S., Alex, R., & Ernest, T. B. (2013). Application of in vitro biopharmaceutical methods in development of immediate release oral dosage forms intended for paediatric patients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 833-842. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.04.015>
- Chen, E. C., Broccatelli, F., Plise, E., Chen, B., Liu, L., Cheong, J., Zhang, S., Jorski, J., Gaffney, K., Umemoto, K. K. & Salphati, L. (2018). Evaluating the Utility of Canine Mdr1 Knockout Madin-Darby Canine Kidney I Cells in Permeability Screening and Efflux Substrate Determination. *Molecular Pharmaceutics*, 15(11), 5103-5113. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00688>
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. (2002). *Guía de Validación de Métodos Analíticos* (1.^a ed.) [Digital].
- Del Castillo-García, S. (2010). *Desarrollo de estudios de permeabilidad de Casiopeína III-ia a través de células MDCK* [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.

- European Medicines Agency. (2022). *Guideline on bioanalytical method validation* [Documento electrónico]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
- García-Ramos, J. C., Vértiz-Serrano, G., Macías-Rosales, L., Galindo-Murillo, R., Toledano-Magaña, Y., Bernal, J. P., Cortés-Guzmán, F., & Ruiz-Azuara, L. (2017). Isomeric Effect on the Pharmacokinetic Behavior of Anticancer Cu(II) Mixed Chelate Complexes: Experimental and Theoretical Approach. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017(12), 1728-1736. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601199>
- Hussen, A. S. (2022). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of advances in chemistry*, 6(1), 010-020. <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>
- ICH Expert Working Group. (2022). *Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10* [Documento electrónico]. https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf
- Kostewicz, E., Abrahamsson, B., Brewster, M. E., Brouwers, J., Butler, J. P., Carlert, S., Dickinson, P. A., Dressman, J. B., Holm, R., Klein, S., Mann, J., McAllister, M., Minekus, M., Muenster, U., Rades, T., Verwei, M., Reppas, C., Weitschies, W., & Augustijns, P. (2014). In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, 342-366. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.024>
- Mares-Sánchez, M. (2013). *Estudios de permeabilidad de propranolol y ranitidina en monocapas celulares de la línea celular MDCK* [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., García-Ramos, J. C., Martínez-Gordillo, M. N., Galindo-Murillo, R., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Tovar-Tovar, A., Flores-Alamo, M., Toledano-Magaña, Y. & Ruiz-Azuara, L. (2019). Antigiardiasic

- activity of Cu(II) coordination compounds: Redox imbalance and membrane damage after a short exposure time. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.012>
- Sadaphal, P., & Dhamak, K. B. (2022). Review article on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method Development and Validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23-29. <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2022.v74i02.003>
- Secretaría de Salud, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2013). NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. En *DOF - Diario Oficial de la Federación* (NOM-177-SSA1-2013). Recuperado 22 de mayo de 2023, de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#sc.tab=0
- U.S. Food and Drug Administration. (2018). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* [Documento electrónico]. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
- U.S. Food and Drug Administration. (2021). M9 Biopharmaceutics Classification System Based Biowaivers Guidance for Industry. En *U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration*.
- Vara-Gama, N., Rubio-Carrasco, K., Espinoza-Guillén, A., Ruiz-Azuara, L. & Fuentes Noriega, I. (2021). Physicochemical and Biopharmaceutical Evaluation of Casiopeina III-Ea, a New Compound with Antineoplastic Activity. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 65(3). <https://doi.org/10.29356/jmcs.v65i3.1471>
- Zitto, H. (2021). *Automated Permeability Assays for Caco-2 and MDCK Cells* [Documento electrónico]. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1576592/FULLTEXT01.pdf>

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 DE SERVICIO SOCIAL

NOMBRE DEL PROYECTO: Validación parcial de un método analítico por HPLC para la cuantificación de Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol en solución salina de Hank

ALUMNO: Oscar Feliciano Reyes

MATRÍCULA: 2183030606

ASESOR INTERNO: M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña (No. Económico: 15677)

ASESOR EXTERNO: M. en C. Inés Fuentes Noriega (Ced. Prof. : 1426701)

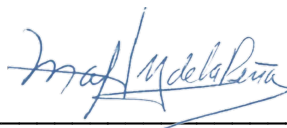
LUGAR DE REALIZACIÓN: Facultad de Química de la UNAM, Laboratorio 113, Conjunto E.

FECHA DE INICIO: 17-02-2023

FECHA DE FINALIZACIÓN: 17-08-2023

REVISIÓN FINAL

Asesor interno

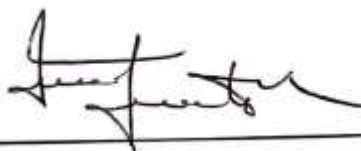


M. en C. Marcela Hurtado de la Peña

Número económico: 15677

Departamento de Sistemas Biológicos

Asesor externo



M. en C. Inés Fuentes Noriega

Cédula Profesional: 1426701

Laboratorio 113, Conjunto E, Facultad de Química UNAM

RESUMEN

El presente reporte se centra en la validación parcial de un método analítico crucial para la cuantificación de Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol en solución salina de Hank para un estudio de permeabilidad utilizando células MDCK. Casiopeína III-Ea es un compuesto de coordinación con cobre (Cu (II)) con actividad antineoplásica, genotóxica y citotóxica, que ha sido objeto de interés debido a su potencial terapéutico contra el cáncer; su comportamiento al atravesar monocapas celulares es esencial para comprender sus propiedades farmacológicas y, por ende, su efectividad clínica. No obstante, en el estudio de permeabilidad se necesita un método para cuantificar el fármaco que atraviesa por la monocapa. La validación meticulosa de este método analítico es esencial para garantizar mediciones coherentes y significativas; una validación parcial se distingue de la validación total en que no se demuestran todos los parámetros, sino, los más críticos o relevantes para una aplicación específica del mismo; en el presente reporte se demostró la especificidad, linealidad, precisión y exactitud del método. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en conformidad con la normatividad nacional mexicana, es decir, la NOM-177-SSA1-2013. Los resultados obtenidos cumplieron con los estándares establecidos por las autoridades regulatorias mexicanas, por ejemplo, para la linealidad del método en los tres casos se obtuvo un $r^2 > 0.99$, una precisión con un CV $< 15\%$, y en exactitud una desviación estándar absoluta DEA $< 15\%$ para los tres fármacos. Esto no solo demuestra la calidad del método analítico, sino que también fortalece la credibilidad de los resultados obtenidos y asegura la aplicabilidad y confiabilidad de los hallazgos en los estudios de permeabilidad posteriores.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en los últimos años el cáncer ha representado una de las principales causas de mortalidad en el continente americano, causando aproximadamente 1.4 millones de muertes en el 2020, con un número de casos de 4 millones, con una proyección hacia el 2040 de un aumento hasta 6 millones de casos. En México, datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía

(INEGI) reportan que en el 2020 se registraron aproximadamente 60 mil defunciones por cáncer y se ha observado que de cada 100 ingresos hospitalarios 73 son por cáncer en tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados, especialmente en la población de 0 a 19 años.

En este sentido, es importante la prevención, no obstante, si la enfermedad se encuentra presente se debe actuar rápido para tener un tratamiento efectivo; la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que se logran altas tasas de curación en algunos cánceres como el seminoma y otros tipos de leucemias y linfomas infantiles si se administra un tratamiento adecuado.

Se han desarrollado distintos fármacos para el tratamiento de leucemia, entre estos se pueden encontrar las Casiopeínas, una familia de compuestos de coordinación de cobre, con una fórmula general Cu (N-N)(O-O)NO_3 o Cu (N-N)(O-N)NO_3 , los cuales fueron diseñados como una alternativa menos tóxica al Cis-platino. Entre estas moléculas destaca la Casiopeína III-Ea, la cual tiene actividad citotóxica, genotóxica y antineoplásica, y se ha presentado como una alternativa en el tratamiento de distintos tipos de leucemia.

En el desarrollo de nuevos fármacos, es importante demostrar el proceso de absorción, distribución, metabolismo y eliminación; si bien, los ensayos *in vivo* son la prueba por excelencia, existen alternativas *in vitro* que permiten predecir el comportamiento *in vivo*. Entre estas pruebas se pueden encontrar los ensayos de permeabilidad en células, especialmente en líneas celulares como Caco2 o MDCK, las cuales demuestran el paso de las moléculas a través de una monocapa celular, que puede representar las condiciones gastrointestinales.

Sin embargo, al realizar este tipo de estudios, se necesita una metodología que permita cuantificar el fármaco o molécula, misma que debe arrojar datos confiables y reproducibles. De acuerdo con la normativa nacional e internacional (guías de la FDA, EMA, ICH, y la NOM 177), los métodos bioanalíticos (aquellos en los cuales se use una matriz biológica como sangre o plasma) deben realizarse con el equipo y la instrumentación especial y de igual forma deben validarse, es decir, cumplir con parámetros como linealidad, precisión, exactitud, estabilidad, etc. No obstante, cuando

el método ha sido utilizado y estandarizado por otro laboratorio y se desea implementar en un laboratorio diferente, se puede recurrir a una validación parcial.

En el presente trabajo se presenta la validación parcial del método analítico para la cuantificación de Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol (estándares de baja y alta permeabilidad), así como su aplicación dentro de un estudio de permeabilidad.

OBJETIVO GENERAL

Realizar una validación parcial de un método analítico por HPLC para cuantificar Casiopeína III – Ea, ranitidina y propranolol en solución salina de Hank para un estudio de permeabilidad en células MDCK

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una determinación de acetaminofén por espectrofotometría UV-Vis para evaluar linealidad, repetibilidad y reproducibilidad del analista.
- Evaluar los parámetros de la validación parcial del método (selectividad, linealidad, adecuabilidad, precisión y exactitud) para Casiopeína III-Ea, ranitidina y propranolol.
- Comparar los resultados obtenidos con las especificaciones descritas en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.
- Aplicar el método para la cuantificación de Casiopeína III – Ea en muestras de un estudio de permeabilidad.

CONCLUSIONES

Los estudios de permeabilidad permiten obtener una aproximación del comportamiento *in vivo* de los medicamentos a partir de modelos *in vitro*. No obstante, es importante realizar una validación a la metodología analítica para asegurar la confiabilidad de esta;

existen diversas normas y reglas, en el país, una de las más importantes es la NOM-177-SSA1-2013. En el presente estudio se realizó la validación parcial del método bioanalítico de tres fármacos, ranitidina, propranolol y Casiopeína III-Ea en solución salina de Hank, obteniendo resultados que concuerdan con lo establecido por la normatividad y que permiten afirmar que el método, en los tres casos, es selectivo, lineal, preciso y exacto; y que puede usarse para el estudio de permeabilidad, ya que se asegura su confiabilidad.

REFERENCIAS

- Adel, E. I., Magda, E., Hanaa, S. & Mahmoud, M. S. (2021). Overview on liquid chromatography and its greener chemistry application. *Annals of Advances in Chemistry*, 5(1), 004-012. <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001023>
- Álvarez-Barrera, L., Rodríguez-Mercado, J. J., López-Chaparro, M. & Altamirano-Lozano, M. A. (2016). Genotoxicity of Casiopeina III-Ea in mouse bone marrow cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(3), 333-338. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1229787>
- Balanced Salt Solutions*. (s. f.). Thermo Fisher Scientific - IE. Recuperado 15 de mayo de 2023, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/balanced-salt-solutions.html>
- Batchelor, H., Kendall, R., Desset-Brethes, S., Alex, R., & Ernest, T. B. (2013). Application of in vitro biopharmaceutical methods in development of immediate release oral dosage forms intended for paediatric patients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 833-842. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.04.015>
- Chen, E. C., Broccatelli, F., Plise, E., Chen, B., Liu, L., Cheong, J., Zhang, S., Jorski, J., Gaffney, K., Umemoto, K. K. & Salphati, L. (2018). Evaluating the Utility of Canine Mdr1 Knockout Madin-Darby Canine Kidney I Cells in Permeability Screening and

Efflux Substrate Determination. *Molecular Pharmaceutics*, 15(11), 5103-5113.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00688>

Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. (2002). *Guía de Validación de Métodos Analíticos* (1.^a ed.) [Digital].

Del Castillo-García, S. (2010). *Desarrollo de estudios de permeabilidad de Casiopeína III-ia a través de células MDCK* [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.

European Medicines Agency. (2022). *Guideline on bioanalytical method validation* [Documento electrónico]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

García-Ramos, J. C., Vértiz-Serrano, G., Macías-Rosales, L., Galindo-Murillo, R., Toledano-Magaña, Y., Bernal, J. P., Cortés-Guzmán, F., & Ruiz-Azuara, L. (2017). Isomeric Effect on the Pharmacokinetic Behavior of Anticancer Cu^{II} Mixed Chelate Complexes: Experimental and Theoretical Approach. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017(12), 1728-1736.
<https://doi.org/10.1002/ejic.201601199>

Hussen, A. S. (2022). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of advances in chemistry*, 6(1), 010-020.
<https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>

ICH Expert Working Group. (2022). *Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10* [Documento electrónico].
https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf

Kostewicz, E., Abrahamsson, B., Brewster, M. E., Brouwers, J., Butler, J. P., Carlert, S., Dickinson, P. A., Dressman, J. B., Holm, R., Klein, S., Mann, J., McAllister, M., Minekus, M., Muenster, U., Rades, T., Verwei, M., Reppas, C., Weitschies, W., & Augustijns, P. (2014). In vitro models for the prediction of in vivo performance of

oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, 342-366.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.024>

Mares-Sánchez, M. (2013). *Estudios de permeabilidad de propranolol y ranitidina en monocapas celulares de la línea celular MDCK* [Tesis de licenciatura].

Universidad Nacional Autónoma de México.

Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., García-Ramos, J. C., Martínez-Gordillo, M. N., Galindo-Murillo, R., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Tovar-Tovar, A., Flores-Alamo, M., Toledano-Magaña, Y. & Ruiz-Azuara, L. (2019). Antigiardiasis activity of Cu(II) coordination compounds: Redox imbalance and membrane damage after a short exposure time. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.012>

Sadaphal, P., & Dhamak, K. B. (2022). Review article on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method Development and Validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23-29.

<https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2022.v74i02.003>

Secretaría de Salud, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

(2013). NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. En *DOF - Diario Oficial de la Federación* (NOM-177-SSA1-2013). Recuperado 22 de mayo de 2023, de

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0

U.S. Food and Drug Administration. (2018). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* [Documento electrónico].

<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

U.S. Food and Drug Administration. (2021). M9 Biopharmaceutics Classification System Based Biowaivers Guidance for Industry. En *U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration*.

Vara-Gama, N., Rubio-Carrasco, K., Espinoza-Guillén, A., Ruiz-Azuara, L. & Fuentes Noriega, I. (2021). Physicochemical and Biopharmaceutical Evaluation of Casiopeina III-Ea, a New Compound with Antineoplastic Activity. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 65(3). <https://doi.org/10.29356/jmcs.v65i3.1471>

Zitto, H. (2021). *Automated Permeability Assays for Caco-2 and MDCK Cells* [Documento electrónico]. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1576592/FULLTEXT01.pdf>