



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE FARMACIA



**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA
LA CUANTIFICACIÓN *in vitro* DE RIFAMPICINA EN PLASMA
DE RATA WISTAR”**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA
JOSÉ MANUEL MARTÍN GRESS

DIRECTOR: M. EN C. ALEJANDRO CHEHUE ROMERO
CODIRECTOR: DRA. ANA LUISA ROBLES PIEDRAS
CODIRECTOR EXTERNO: DR. SERGIO ARTURO GALINDO
RODRÍGUEZ

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO AGOSTO 2014

ÍNDICE.

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	v
RESUMEN.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Breve historia de la tuberculosis.....	4
2.2. La tuberculosis y el <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.3. Epidemiología de la tuberculosis.....	7
2.4. Tratamiento de la tuberculosis.....	9
2.5. Rifampicina y tuberculosis.....	10
2.6. Tecnología farmacéutica en el tratamiento de la tuberculosis.....	13
2.7. Validación de métodos analíticos.....	14
2.8. Uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución en la validación de métodos analíticos.....	16
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPÓTESIS.....	21
V. OBJETIVO GENERAL.....	22
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
VII. METODOLOGÍA.....	23
7.1. Metodología para estandarizar la obtención de plasma de rata Wistar..	23
7.2. Metodología para determinar las condiciones cromatográficas del método analítico.....	25
7.2.1. Características del equipo, material de laboratorio y reactivos...	25
7.2.2. Preparación de la solución de referencia.....	25
7.2.3. Determinación de las condiciones cromatográficas.....	26
7.3. Metodología para determinar los parámetros de desempeño para la validación del método analítico.....	26
7.3.1. Adecuabilidad del sistema.....	28
7.3.2. Linealidad del sistema.....	28
7.3.3. Exactitud y repetibilidad del método.....	29
7.3.4. Linealidad del método.....	29
7.3.5. Reproducibilidad del método.....	30
7.3.6. Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	31

7.3.7. Robustez.....	31
7.3.8. Estabilidad analítica de la muestra.....	32
VIII. RESULTADOS.....	34
8.1. Resultados de la estandarización de la obtención de plasma de rata Wistar.....	34
8.2. Resultados de la determinación de las condiciones cromatográficas del método analítico.....	34
8.3. Resultados de la determinación de los parámetros de desempeño para la validación del método analítico.....	36
8.3.1. Adecuabilidad del sistema.....	36
8.3.2. Linealidad del sistema.....	37
8.3.3. Exactitud y repetibilidad del método.....	40
8.3.4. Linealidad del método.....	41
8.3.5. Reproducibilidad del método.....	44
8.3.6. Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	45
8.3.7. Robustez.....	47
8.3.8. Estabilidad analítica de la muestra.....	48
IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	51
X. CONCLUSIONES.....	60
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	61
XII. ANEXOS.....	72
Anexo 1. Determinación de los parámetros cromatográficos.....	72
Anexo 2. Metodología para preparar la fase móvil.....	73
Anexo 3. Fórmulas utilizadas.....	76
Anexo 4. Datos registrados de tres muestras de rifampicina analizadas a la condición cromatográfica determinada para el método.....	78
Anexo 5. Datos de área, altura y tiempos de retención de una muestra de 500 µg/mL de rifampicina analizada en seis diferentes condiciones cromatográficas.....	79
Anexo 6. Cromatogramas de una muestra de 500 µg/mL de rifampicina analizada en seis diferentes condiciones cromatográficas.....	80
Anexo 7. Datos de los cromatogramas registrados en la determinación de la estabilidad analítica de la muestra.....	82
Anexo 8. Cromatograma de una muestra de rifampicina sin BHT, almacenada durante 24 horas a temperatura ambiente y expuesta a la luz.....	84
XIII. GLOSARIO.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
Figura 2. Incidencia estimada de casos de tuberculosis durante el 2012 según la OMS.....	8
Figura 3. Estructura molecular de la rifampicina.....	12
Figura 4. Componentes básicos de un equipo de HPLC.....	19
Figura 5. Metodología para la obtención de plasma de rata Wistar.....	24
Figura 6. Proceso de la elaboración de la SRef-RIF, de las muestras y de su análisis.....	27
Figura 7. Línea base establecida a las condiciones cromatográficas determinadas.....	35
Figura 8. Cromatograma de una inyección de 25µL de SRef-RIF a las condiciones cromatográficas determinadas.....	35
Figura 9. Curva de calibración Concentración Vs Área para la determinación de la linealidad del sistema.....	39
Figura 10. Curva de calibración Concentración Vs Altura para la determinación de la linealidad del sistema.....	40
Figura 11. Curva de calibración Concentración teórica Vs Concentración recuperada para la determinación de la linealidad del método.....	43
Figura 12. Curva de calibración Concentración Vs Área para calcular el valor del Límite de Detección y el Límite de Cuantificación.....	47
Figura 13. Elementos de un pico cromatográfico.....	72
Figura 14. Preparación de la solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27.....	74
Figura 15. Filtración y desgasificación de ACN.....	75
Figura 16. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a la condición determinada para el método.....	78
Figura 17. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a 25 °C, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (59:41).....	80
Figura 18. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a 25 °C, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (65:35).....	80
Figura 19. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a 25 °C, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.4 (61:39).....	80
Figura 20. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a 25 °C, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.0 (61:39).....	81
Figura 21. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a 18 °C, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (61:39).....	81
Figura 22. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a 25 °C, a 1.5 mL/min y a una proporción de fase móvil ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (61:39).....	81
Figura 23. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF preparada sin BHT, almacenada a temperatura ambiente y expuesta a la luz.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Adecuabilidad del sistema del método HPLC para la cuantificación <i>in vitro</i> de rifampicina en plasma de rata Wistar.....	36
Tabla 2. Parámetros cromatográficos obtenidos en la determinación de la adecuabilidad del sistema del método HPLC para la cuantificación <i>in vitro</i> de rifampicina en plasma de rata Wistar.....	37
Tabla 3. Ensayo de linealidad del sistema del método HPLC para la cuantificación <i>in vitro</i> de rifampicina en plasma de rata Wistar.....	38
Tabla 4. ANOVA realizado con el área de los picos cromatográficos obtenidos...	39
Tabla 5. Exactitud y Repetibilidad del método HPLC para la cuantificación <i>in vitro</i> de rifampicina en plasma de rata Wistar.....	41
Tabla 6. Ensayo de linealidad del método HPLC para la cuantificación <i>in vitro</i> de rifampicina en plasma de rata Wistar.....	42
Tabla 7. ANOVA realizado con los datos de concentración de rifampicina recuperada.....	43
Tabla 8. Registro de datos obtenidos por 2 analistas diferentes en 2 días diferentes para determinar la reproducibilidad del método.....	44
Tabla 9. Reproducibilidad del método HPLC para la cuantificación <i>in vitro</i> de rifampicina en plasma de rata Wistar.....	45
Tabla 10. Datos que se utilizaron en la determinación del Límite de Detección y del Límite de Cuantificación.....	46
Tabla 11. Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método HPLC para la cuantificación <i>in vitro</i> de rifampicina en plasma de rata Wistar.....	46
Tabla 12. Robustez del método HPLC para la cuantificación <i>in vitro</i> de rifampicina en plasma de rata Wistar.....	48
Tabla 13. Estabilidad analítica de las muestras de RIF almacenadas a temperatura ambiente, expuestas a la luz y preparadas sin BHT.....	49
Tabla 14. Estabilidad analítica de las muestras de RIF almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz.....	50
Tabla 15. Estabilidad analítica de las muestras de RIF almacenadas a 4 °C y protegidas de la luz.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de la Varianza
ARN	Ácido Ribonucleico
BHT	Butilhidroxitolueno
cm	Centímetro
CV	Coeficiente de Variación
CV_{Y/X}	Coeficiente de Variación de la regresión
DOTS / TAES	Directly Observed Treatment Short Course/ Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
H	Altura del plato teórico
HPLC / CLAR	High Performance Liquid Chromatography/ Cromatografía Líquida de Alta Resolución
INH	Isoniazida
IC (β_0)	Intervalo de Confianza para la ordenada al origen
IC (β_1)	Intervalo de Confianza para la pendiente
IC (μ)	Intervalo de Confianza para la media poblacional
k	Factor de retención
L	Litro
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
M	Molar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
μg	Microgramo
μL	Microlitro
N	Eficiencia de la columna
nm	Nanómetro

OMS	Organización Mundial de la Salud
r	Coeficiente de correlación
r²	Coeficiente de determinación
R	Resolución
RIF	Rifampicina
S	Desviación estándar
S_{Y/X}	Desviación estándar de la regresión
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SFPMB	Solución amortiguadora de Fosfato de Potasio Monobásico 0.05 M
SM	Estreptomina
SRef-RIF	Solución de referencia de rifampicina
TB	Tuberculosis
t_R	Tiempo de retención
UAEH	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV/Vis	Ultravioleta / Visible
v/v	Volumen / Volumen
°C	Grados Centígrados/ Celsius
>	Mayor a
<	Menor a
≥	Mayor o igual a
≤	Menor o igual a

RESUMEN.

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que afectan al ser humano, hasta la fecha un tercio de la población del mundo está infectada y al año 1.6 millones de personas mueren a causa de ella. En los últimos años, investigadores de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) han trabajado en el desarrollo de sistemas nanoparticulados de liberación controlada a base de rifampicina, sistemas principalmente de administración oral que en teoría garantizan una máxima absorción del fármaco a fin de mejorar la efectividad del tratamiento antituberculoso. Investigadores de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) trabajan en conjunto con los investigadores de la UANL realizando estudios encaminados hacia la evaluación farmacocinética preclínica de estos nuevos sistemas, razón por la cual se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar in vitro rifampicina en plasma de rata Wistar. El método se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa con una columna de 150 x 4.6 mm rellena de sílice con un tamaño de partícula de 5 µm y una fase móvil compuesta por una mezcla de acetonitrilo y una solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (61:39 v/v) a una longitud de onda de 254 nm. El tiempo de retención de la rifampicina fue de 1.400 minutos, el ensayo fue lineal de 5 a 500 µg/mL, los parámetros de repetibilidad, exactitud, reproducibilidad, sensibilidad, estabilidad y robustez cumplieron con lo establecido en las guías nacionales e internacionales de validación de métodos analíticos. Por lo tanto, el método analítico desarrollado y validado puede ser usado para la cuantificación de rifampicina en la evaluación farmacocinética preclínica en rata Wistar de estos nuevos sistemas nanoparticulados que realizarán en conjunto los investigadores de la UANL y UAEH.

I.- INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que ha acompañado a la humanidad a lo largo de su historia como civilización, es una enfermedad que afecta al sistema respiratorio y que si no es tratada a tiempo causa la muerte a quien la padece.¹ La tuberculosis es causada por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis* y durante la mayor parte de la historia de la humanidad, un diagnóstico de esta enfermedad equivalía a una sentencia de muerte.²

No fue sino hasta a mediados del siglo pasado cuando pareció que se había encontrado una cura al inventarse la estreptomina (SM) el primer antibiótico contra la tuberculosis, por fin la medicina contaba con un modo de combatir esta terrible enfermedad y para finales de 1960 existía ya un vasto arsenal de antibióticos para tratarla, fue entonces que el mundo entero creyó que finalmente había podido erradicar a la tuberculosis, sin embargo no fue así.³⁻⁵ La tuberculosis solo fue erradicada de los países desarrollados mientras que los países subdesarrollados y en vías de desarrollo continuaron padeciendo esta enfermedad.^{2,3} El *Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria que constantemente pasa por mutaciones genéticas para volverse más adaptable al medio ambiente que la rodea, tanto es así que la bacteria ha logrado desarrollar cierta inmunidad o mejor dicho resistencia a la mayoría de los antibióticos que se usan para combatirla.⁷

La Organización Mundial de la Salud (OMS) asegura en sus últimos informes que un tercio de la población total del planeta padece tuberculosis latente, asegura que al año 1.6 millones de personas mueren a causa de tuberculosis en todas sus formas (pulmonar y extra pulmonar) y que la mayoría de las víctimas son de países subdesarrollados, la OMS asegura también que los pacientes con tuberculosis multirresistente a fármacos antituberculosos suman más de 50 millones en todo el mundo y que cada año la cifra aumenta.⁸ Toda esta

información hace evidente que la pandemia de esta enfermedad sigue empeorando y no mejorando, que nunca desapareció y que esta vez los antibióticos convencionales no podrán contenerla.

Sin embargo ante el peligro latente, la tuberculosis continúa siendo una enfermedad desatendida por la industria farmacéutica, pues esta última ha hecho una escasa investigación e inversión por desarrollar nuevos productos destinados al tratamiento de la tuberculosis por considerarla una enfermedad de países pobres. Ante esta situación, investigadores de todo el mundo realizan experimentos para mejorar el recubrimiento, la absorción y la biodisponibilidad de los fármacos antituberculosos, principalmente el de la rifampicina, uno de los fármacos clave en el tratamiento de la tuberculosis.⁹

En nuestro país, investigadores de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) han desarrollado varios sistemas nanoparticulados de liberación controlada a base de rifampicina, muchos de ellos de administración oral que en teoría ofrecen ventajas respecto a las formulaciones convencionales que existen en el mercado, el principal objetivo de estos sistemas es mejorar la efectividad del tratamiento, aumentar la concentración en los órganos infectados, disminuir los efectos adversos y aumentar la estabilidad química y biológica de la rifampicina. Por otro lado, investigadores de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) colaboran con los investigadores de la UANL realizando investigaciones encaminadas a la evaluación farmacocinética preclínica de estos nuevos sistemas, para ello los investigadores de la UAEH buscan desarrollar una metodología de medición que les permita cuantificar *in vitro* la sustancia de interés con resultados fiables antes de iniciar con la investigación *in vivo*.

Esta metodología de medición o método analítico, se define como una secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico en una muestra.¹⁰ Y para poder utilizar adecuadamente un método analítico e interpretar los resultados

obtenidos de manera correcta, es necesario que el método esté validado antes de ser empleado de forma rutinaria en el laboratorio para así asegurar su robustez y reproducibilidad.¹¹

En el presente trabajo de investigación, se pretende desarrollar y validar un método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para cuantificar *in vitro* rifampicina en plasma de rata Wistar, se determinarán procedimientos específicos para la obtención del plasma de rata así como las condiciones cromatográficas ideales para la cuantificación de rifampicina. Este trabajo de investigación, busca que el método analítico pueda ser empleado como herramienta principal en la cuantificación de rifampicina durante la evaluación farmacocinética preclínica en rata Wistar de los sistemas nanoparticulados anteriormente mencionados con la finalidad de evaluar su eficacia.

II.- MARCO TEÓRICO.

2.1. Breve historia de la tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades que ha acompañado al hombre desde la más remota antigüedad, las antiguas civilizaciones padecieron TB según las inscripciones en tablillas babilónicas y otros vestigios de la antigüedad, a la enfermedad se le conoció por varios nombres: tisis, escrofulosis, plaga blanca, consunción y enfermedad del agotamiento.^{1,2} La mayoría de los médicos antiguos creía que la TB era hereditaria, pero ya Aristóteles (384-322 a.C.) y subsecuentemente Galeno (131-201), Avicena (980-1037), Francastoro (1478-1553), Morgagni (1682-1771) y muchos otros pensaron que se trataba de una enfermedad infecciosa y contagiosa.² El primero en descubrir que la TB se trataba de una enfermedad infecciosa fue el médico francés Jean-Antonie Villemin (1834-1913), quien pudo demostrarlo con sus brillantes experimentos en los que inoculó material caseoso procedente de animales de experimentación infectados con TB en otros animales de experimentación completamente sanos, sus hallazgos causaron grandes controversias y para 1867 en París, se nombró una comisión, misma que después de analizar sus experimentos concluyó: "Estas ideas no se asientan sobre bases firmes".^{2,3} No pasó mucho tiempo sin que los hallazgos de Villemin se confirmaran y fueran aceptados por todos, pues en 1882 el médico alemán Roberto Koch descubrió al bacilo bacteriano causante de esta enfermedad y a partir de ahí, se le asignó su verdad etiológica e inició su estudio completo para llegar a descubrir su intimidad anatomopatológica con el ser humano.¹⁻⁴

Durante y después de la Segunda Guerra Mundial, Europa se encontró con una gran epidemia de TB, pero tuvo la suerte de que los mejores cerebros de esa época se dedicaran a buscar las técnicas más eficaces para enfrentarla.² En 1943 los patólogos ucranianos Waksman y Shatz publicaron los efectos del extracto del hongo *Streptomyces griseum* sobre distintas especies bacterianas mencionando

en una de sus líneas, que "*in vitro*", se inhibía el crecimiento de la bacteria causante de la TB, para 1944 se trató por primera vez a una mujer de 24 años portadora de una TB aguda con el extracto de este hongo (conocido hoy como estreptomomicina) y meses después se asistió el milagro de su curación. A partir de ahí y en rápida sucesión, se fueron descubriendo una serie de fármacos con acción antituberculosa y para finales de la década de los 60's se contaba con un vasto arsenal de ellos además de que se diseñaron investigaciones cada vez más científicas para conocer las asociaciones más efectivas de su administración.^{2,5}

Tuvieron que pasar más de 60 años desde aquel descubrimiento de Koch para que la humanidad tuviera en sus manos el primer antibiótico para combatir a la TB y a pesar de todos los conocimientos disponibles hoy en día, la TB no está derrotada y sigue siendo actualmente la enfermedad infecciosa más importante de nuestra época.

2.2. La tuberculosis y el *Mycobacterium tuberculosis*.

La TB es una enfermedad que afecta principalmente al sistema respiratorio, ataca al estado general y si no es tratada oportuna y eficientemente puede causar la muerte a quien la padece, además la afección es curable en la mayoría de los casos y se puede prevenir.⁶⁻⁸ La infección se transmite de persona a persona a través del aire; cuando un enfermo de tuberculosis pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsa gotas de saliva cargadas con bacilos tuberculosos, la mayoría de las gotas secan pronto, pero las menores (<10 µm de diámetro) pueden permanecer suspendidas en el aire durante varias horas y solo se necesita que una persona inhale unas cuantas gotitas para quedar infectada, se estima que con cada golpe de tos se pueden expulsar al menos 3000 gotitas contagiosas.⁷

La TB es causada por una bacteria perteneciente al orden de los *Actinomycetales* de la familia *Mycobacteriaceae* del género *Mycobacterium*, este género está compuesto por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. africanum*, *M. microti*, *M.*

canettii, *M. leprae* y *M. kansasii*; de ellas, *M. tuberculosis* es el principal agente responsable de enfermedad en los seres humanos.^{6, 7, 12} El *M. tuberculosis* es un bacilo aerobio inmóvil no esporulado con un tamaño de 0.2 a 0.6 x 1 a 10 µm, posee un tiempo de duplicación de 18-24 horas, su pared celular es rica en lípidos y esta característica es responsable de la escasísima permeabilidad de la misma y por lo tanto de la ineficacia que muestran contra este microorganismo la mayor parte de los antibióticos.^{7,12} En la membrana plasmática se encuentran ancladas proteínas, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomanano (LAM), este último interviene en la patogenia de la interacción agente patógeno-hospedador que favorece la supervivencia de *M. tuberculosis* en el interior de los macrófagos. A lo largo de las capas de la pared celular se intercalan proteínas transportadoras y porinas las cuales constituyen el 15 % del peso de la misma, una capa de peptidoglucano forma el esqueleto básico al que se le unen los arabinogalactanos (polisacáridos ramificados formados por D-arabinosa y D-galactosa), el residuo terminal de D-arabinosa se esterifica para dar lugar a ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular a los que se le anclan glicolípidos de superficie que representan un 60 % del peso de la pared celular; éstas dos últimas estructuras constituyen antígenos importantes a nivel biológico ya que estimulan la respuesta inmunitaria celular del paciente frente a la infección (Figura 1).^{7, 12-16}

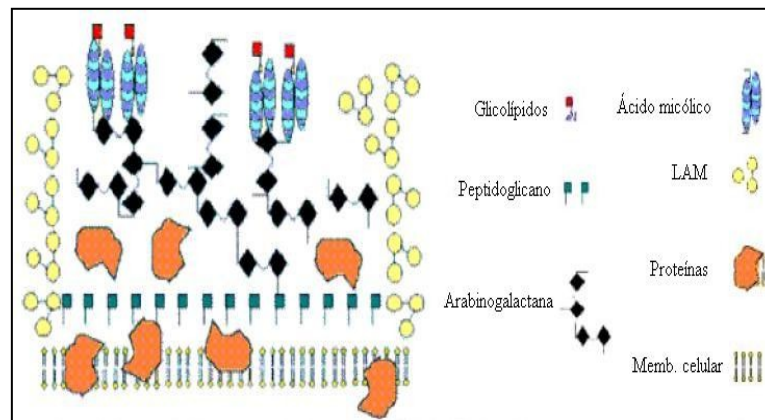


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*.*

* Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. Imagen tomada del sitio: <http://pikeralbeiro.wikispaces.com/QUIMICA+CELULAR+DEL+M.+TUBERCULOSIS> Modificada por: José Manuel Martín Gress. Fecha de descarga: 27 Jun 2014.

Una vez que *M. tuberculosis* ingresa en las vías respiratorias y llega hasta los alvéolos es digerido por los macrófagos, pero a diferencia de la mayor parte de las bacterias fagocitadas, *M. tuberculosis* impide la fusión del fagosoma con los lisosomas evitando su destrucción y diseminándose hacia los ganglios linfáticos locales, al torrente circulatorio y a otros tejidos.¹⁴⁻¹⁶ La TB suele dividirse en pulmonar y extra pulmonar; la TB pulmonar puede ser primaria y postprimaria, la TB pulmonar primaria es la que aparece consecutivamente a la infección inicial por el bacilo tuberculoso y la postprimaria se debe a una infección de reactivación y también es conocida como TB pulmonar secundaria o de tipo adulto.^{7, 17, 18} Fuera del pulmón (extra pulmonar), los sitios donde con mayor frecuencia se localiza la TB son por orden de frecuencia: ganglios linfáticos, pleura, aparato genitourinario, huesos, articulaciones, meninges, bazo, hígado, peritoneo y miliar (diseminada).^{7, 17, 19, 20} En las primeras fases evolutivas de la enfermedad las manifestaciones clínicas suelen ser inespecíficas e insidiosas consistiendo ante todo en fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, anorexia, malestar general, debilidad, tos que al principio es seca y que después es acompañada de una expectoración purulenta con estrías de sangre.^{6, 7, 17}

2.3. Epidemiología de la tuberculosis.

La TB es la segunda causa mundial de mortalidad causada por un agente infeccioso y es la principal causa de muerte en personas con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).⁸ Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) un tercio de la población mundial padece TB latente, al año se presentan de 8 a 9 millones de casos nuevos en todo el mundo y de 1.2-1.5 millones de defunciones por esta causa.^{7, 21, 22} Durante el 2012, la OMS registró 8.6 millones de personas infectadas con TB (pulmonar y extra pulmonar) y 1.3 millones de defunciones, también informó que el 95 % de las muertes ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos principalmente de Asia, África, Oriente Medio y América Latina (Figura 2).⁸

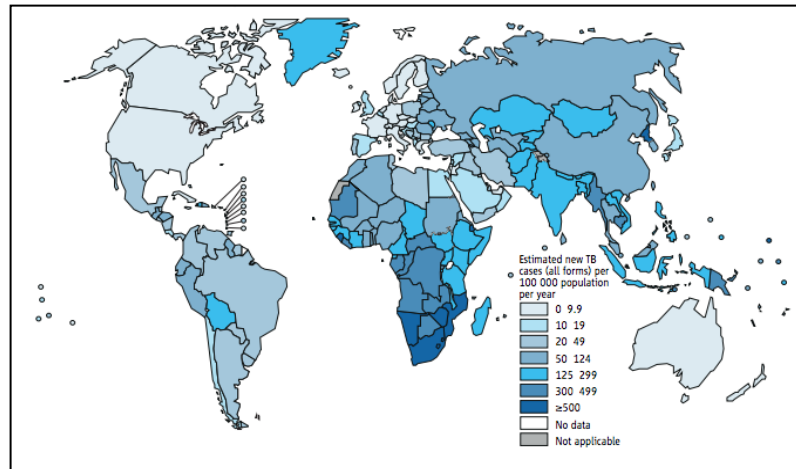


Figura 2. Incidencia estimada de casos de tuberculosis durante el 2012 según la OMS.*

En México, durante ese mismo año de acuerdo con la información preliminar de la Plataforma Única de Tuberculosis se registraron 19,445 casos de TB (pulmonar y extra pulmonar), de todos los casos notificados la forma más frecuente fue la pulmonar con 15,843 casos predominando más en el sexo masculino que en el femenino a razón de 1.5:1 afectando principalmente a la población económicamente activa (18-49 años), el 20.8 % del total de los casos presentaba diabetes mellitus, el 7.8 % estaba vinculado al SIDA y el 9.3 % correspondía a casos pediátricos (<18 años).^{23,24} Los estados del país con mayor incidencia de TB son: Baja California Norte, Baja California Sur, Guerrero, Tamaulipas, Sonora, Nayarit, Sinaloa, Veracruz, Tabasco, Colima, Nuevo León y Chiapas.^{14,23,24} En el estado de Hidalgo se registraron 313 casos de TB (pulmonar y extra pulmonar) asociados principalmente a alcoholismo, desnutrición y diabetes mellitus, se presentaron 9 casos de TB multirresistente a fármacos antituberculosos por lo que Hidalgo formó parte de la lista de los 14 estados del país que concentraron el 81 % del total de casos de TB multirresistente a fármacos antituberculosos, también se informó que en Hidalgo existen 18 municipios con población indígena de los cuales procedía el 36 % del total de casos de TB registrados en el estado.²⁴

* OMS[®], Estimated TB incidence rates 2012. Imagen tomada del sitio Infectosos.com: <http://www.infectosos.com/2013/10/situacion-actual-de-la-tuberculosis.html>
Fecha de descarga: 12 Mayo 2014.

2.4. Tratamiento de la Tuberculosis.

El tratamiento de la TB se basa en conceptos muy distintos al de las demás infecciones bacterianas.²⁵ Esto se debe a que el *M. tuberculosis* posee una pared celular impermeable, un tiempo de duplicación prolongado (18-24 horas comparado con los 30-40 minutos requeridos por otras bacterias) y una gran capacidad para entrar en períodos de latencia con una actividad metabólica limitada que dificulta la acción de los fármacos antituberculosos.²⁶

Por otro lado, estudios genéticos han demostrado que la resistencia a fármacos antituberculosos por parte de *M. tuberculosis* se debe a mutaciones cromosómicas espontáneas en los genes que codifican la diana del fármaco.²⁵⁻²⁷ Sin embargo estas características no son las únicas que interfieren en el tratamiento antituberculoso, recientemente han habido informes de casos en que los pacientes responden mal al tratamiento debido a la presencia de concentraciones plasmáticas subterapéuticas de fármacos antituberculosos.^{28,29} Esto podría deberse al retraso en la detección y tratamiento de la enfermedad, al incumplimiento terapéutico por parte del paciente, a la resistencia a múltiples fármacos y a otras enfermedades concomitantes.²⁸

Los fármacos antituberculosos matan al *M. tuberculosis* en su fase de división y guardan entre sí muy poca relación, al menos aparente en su estructura o en su mecanismo íntimo de acción y quizás a ello se deba la eficacia de su administración combinada, por ello suelen dividirse en función de su valor terapéutico en dos grandes grupos:^{6, 7, 17, 25, 27, 30, 31}

a) Principales o de primera línea: poseen un alto índice eficacia/riesgo por lo que deben ser empleados en primer lugar, estos son: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB), estreptomycin (SM) y pirazinamida (PZA).

b) Secundarios, menores o de segunda línea: su índice eficacia/riesgo es menor, pero pueden resultar muy eficaces cuando la toxicidad y la resistencia a los anteriores los deja fuera de juego, estos son: capreomicina, kanamicina, etionamida, ácido para-aminosalicílico (PAS) y cicloserina.

Los objetivos del tratamiento antituberculoso han sido clásicamente dos: la eliminación rápida de los bacilos y la prevención de recaídas. Para conseguir estos objetivos se deben tener en cuenta dos principios fundamentales: la terapéutica debe consistir siempre en dos o más fármacos a los que el bacilo sea sensible y que el tratamiento dure 3-6 meses hasta que el esputo se halla hecho negativo, sin embargo la lentitud del tratamiento disminuye el cumplimiento terapéutico en los pacientes y provoca la aparición de recaídas.^{27, 32}

El tratamiento de la TB está basado en un régimen terapéutico cuádruple que la mayoría de los países siguen según los lineamientos de la OMS a través de la estrategia llamada Directly Observed Treatment Short course (DOTS) o Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) que consiste en la toma de los fármacos antituberculosos por parte del paciente y que es supervisado por el personal de salud para asegurar el cumplimiento del tratamiento.^{8, 26, 32-34} En esta estrategia de tratamiento se utilizan fármacos antituberculosos con actividad bactericida principalmente RIF, INH, PZA, SM y EMB, consta de una fase inicial de dos meses con INH, RIF, PZA y EMB o SM seguida de una fase de cuatro meses de duración con RIF e INH; como se ve, RIF e INH constituyen los fármacos antituberculosos clave en esta estrategia de tratamiento.^{6, 26, 33, 34}

2.5. Rifampicina y tuberculosis.

Las cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a RIF e INH con o sin resistencia a otros fármacos antituberculosos, han sido denominadas cepas multirresistentes a fármacos antituberculosos y la clave determinante de fallas en el tratamiento la constituye la resistencia a RIF, al menos el 90 % de todos los

aislamientos resistentes a RIF son también resistentes a INH, por lo tanto un resultado de resistencia a RIF nos dice si una cepa es o no multirresistente a fármacos antituberculosos.^{32,36,37} La OMS estima que más de 50 millones de personas a nivel mundial podrían estar infectadas con estas cepas provocando que los regímenes terapéuticos en estos pacientes sean menos efectivos, aún más prolongados, de difícil cumplimiento y más costosos.^{26, 32,36}

La RIF es un derivado semisintético de la rifamicina S, sustancia que se obtiene del extracto del hongo *Amycolatopsis rifamycinica* (anteriormente conocido como *Amycolatopsis mediterranei* o *Streptomyces mediterranei*) y que fue descubierta por el químico italiano Piero Sensi en 1966. El mecanismo de acción de la RIF consiste en unirse a la subunidad β de la ARN polimerasa de *M. tuberculosis*, esta enzima es la encargada del proceso de transcripción de genes y al inhibirse la expresión de estos, la RIF provoca la muerte de la bacteria.^{25, 27, 30, 31,35}

La inmensa mayoría de los pacientes toleran bien la RIF, comúnmente la orina, las heces, la saliva, el sudor, el semen y las lágrimas pueden teñirse de rojo o naranja, también al inicio del tratamiento se pueden producir algunas molestias digestivas, erupción cutánea, algias musculares y articulares pero la reacción más frecuente e importante es de carácter hepático.^{27,30,31} En las primeras semanas del tratamiento puede aparecer una ictericia asintomática de tipo colestásico que se debe a fenómenos de competencia entre la captación de bilirrubina y la RIF en la célula hepática y pueden aparecer signos de disfunción con aumento de enzimas hepáticas.³⁸ Se han descrito también síntomas de tipo neurológico como: fatiga, somnolencia, cefalea, mareo, ataxia, desorientación, falta de concentración y parestesias, a veces ocurre una reacción de tipo inmunológico muy frecuente según algunos si la administración es por vía intravenosa y que consiste en un síndrome de carácter gripal con disnea, sibilancias, púrpura con trombocitopenia, leucopenia y rara vez hematuria, hemoglobinuria e insuficiencia renal.^{7, 25, 27, 30, 31,35}

La RIF induce fuertemente a la mayoría de las enzimas del complejo enzimático CYP450 en hígado e intestino.^{27,35,39} Por lo que la RIF aumenta el efecto/toxicidad del clopidrogel, inhibidores de la HMG-CoA reductasa y de la isoniazida; por otro lado fármacos como el fluconazol, voriconazol, antibióticos macrolidos, antivirales inhibidores de la proteasa y la pirazinamida aumentan las concentraciones/efectos de RIF; la RIF disminuye las concentraciones/efectos de fármacos como la amiodarona, bloqueadores del receptor de angiotensina II, barbitúricos, benzodiazepinas, beta bloqueadores, antagonistas de los canales de calcio, caspofungina, cloranfenicol, anticonceptivos (estrógenos y progestinas), fenitoína, terbinafina y ácido valproico.³⁵ La RIF se absorbe muy bien por la vía oral aunque los alimentos pueden retrasar su absorción, atraviesa cualquier membrana por su carácter lipofílico, su metabolismo es principalmente hepático, una dosis de 600 mg produce una concentración sérica máxima de 10 µg/mL en 2-4 horas con una vida media de 3-4 horas que se puede prolongar en disfunción hepática y en insuficiencia renal terminal hasta por 11 horas, se excreta principalmente en heces (60-65 %) y en orina (40-35 %) como fármaco sin cambios.^{27, 30, 31,35} En la Figura 3 se puede apreciar la estructura molecular de la RIF.

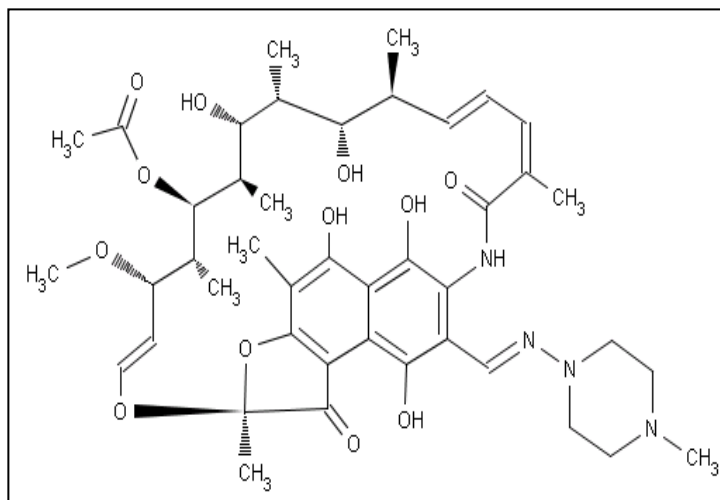


Figura 3. Estructura molecular de la rifampicina.*

* Estructura molecular de la rifampicina. José Manuel Martín Gress / Chem Draw® Pro 12.0. Fecha de elaboración: 22 Nov 2013. Archivo del autor.

La RIF es un fármaco que posee una alta permeabilidad y al mismo tiempo una solubilidad pH-dependiente, pues la estabilidad máxima de la molécula se encuentra a un pH de 7.4, pero a un pH de 7.5 a 9.0 la molécula se oxida y a un pH menor de 2.0 la molécula sufre hidrólisis ácida.⁴⁰ La molécula de RIF es muy sensible a la oxidación, a la luz, a la humedad y al calor excesivo (40 °C o más), por lo que es necesario continuar estudiando los aspectos más relevantes de su fase sólida, las interacciones con excipientes y fármacos así como las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas más importantes con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad de la RIF presente en todas las combinaciones y presentaciones.^{9,40}

2.6. Tecnología farmacéutica en el tratamiento de la tuberculosis.

Actualmente investigadores del mundo entero trabajan arduamente buscando y desarrollando nuevas ideas que ayuden a mejorar el tratamiento antituberculoso. Entre estas ideas se encuentran los sistemas de liberación controlada a base de fármacos antituberculosos que ofrecen ventajas respecto a las formulaciones convencionales con el único fin de mejorar la efectividad del tratamiento, aumentar la concentración en los órganos infectados, disminuir los efectos adversos y aumentar la estabilidad química y biológica de estos fármacos.^{9,41} Ejemplo de ello son los sistemas de nanopartículas que incorporan en su interior RIF, estos sistemas permiten dirigir a la molécula de RIF a los distintos tejidos infectados liberándola de manera sostenida en el tiempo minimizando su degradación, incrementando su semivida en el interior del órgano a tratar y disminuyendo su toxicidad.⁴¹⁻⁴⁵ En México, un grupo de investigadores de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) han logrado desarrollar algunos de estos sistemas nanoparticulados principalmente de administración oral, al mismo tiempo colaboran con investigadores del Cuerpo Académico de Farmacia Clínica del Área Académica de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) realizando investigaciones encaminadas a la evaluación farmacocinética preclínica de estos nuevos sistemas. Sin embargo, para poder

llevar a cabo estos estudios, existe la necesidad de contar con una metodología que permita cuantificar *in vitro* la sustancia de interés y que cumpla con los atributos de fiabilidad correspondientes antes de iniciar con una investigación *in vivo*.

2.7. Validación de métodos analíticos.

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) en una muestra.⁴⁹⁻⁵¹ Un analito se define como el componente específico de una muestra a medir en un análisis; por lo tanto, un método analítico mide un componente específico en una muestra y como en todo proceso de medición, este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.^{50,52,53}

Los métodos analíticos deben ser validados para asegurar su robustez y reproducibilidad, además, el proceso de validación demuestra por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada al mismo tiempo que examina las características de desempeño del método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse del mismo cuando se aplique a un tipo específico de muestras.⁴⁹⁻⁵³ La validación es considerada una parte esencial durante el desarrollo de un método analítico, pues es la evaluación que asegura que el método es el apropiado para el análisis en cuestión y que los resultados obtenidos son fiables y consistentes.⁵⁴ En general, para que un método analítico esté validado, es necesario que cumpla con los siguientes parámetros de desempeño: ^{10,49-51,53,55,56}

- **Adecuabilidad del Sistema:** Es la evaluación de la aptitud del sistema que permite verificar si el sistema de medición funciona apropiadamente e independientemente de las condiciones ambientales.

- **Especificidad/Selectividad:** Es la verificación de la capacidad del método de estimar de forma unívoca los analitos en presencia de los demás componentes.
- **Estabilidad Analítica de la Muestra:** Es la expresión que demuestra que el analito se mantiene estable durante todo el procedimiento de análisis incluido su almacenamiento antes y después de éste.
- **Exactitud:** Es la evaluación que expresa que tan estrecha, concordante y paralela es la relación entre el valor convencional verdadero o de referencia y el valor que se encontró en el análisis.
- **Límite de Cuantificación:** Es la concentración más baja a la cual el analito puede cuantificarse con una precisión y veracidad aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas.
- **Límite de Detección:** Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas.
- **Linealidad del Sistema/Método:** es la capacidad del sistema/método para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida.
- **Precisión del Método / Precisión Intermedia / Reproducibilidad:** Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días.
- **Repetibilidad:** Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo.
- **Robustez:** Es la medida de la capacidad del método analítico de permanecer inalterado por pequeñas pero deliberadas variaciones (efecto de cambio en las condiciones analíticas) en los parámetros del mismo,

proporcionando así un índice de su confiabilidad durante su uso en condiciones normales.

- **Tolerancia:** Es el grado de reproducibilidad del método analítico en diversas condiciones, pero que a diferencia de la robustez, estas variaciones involucran: variaciones de día a día, de analista a analista, de laboratorio a laboratorio, de instrumento a instrumento, etc.

Estos requisitos constituyen una guía para dar al analista un soporte técnico y adecuado para tener las herramientas necesarias al momento de resolver cada caso en particular.^{50,52} Por lo que es necesario especificar que en función de la aplicación analítica del método, cada analista determinará bajo criterios bien justificados y teniendo en cuenta los objetivos que se pretendan alcanzar, que parámetros de desempeño deben ser considerados en cada procedimiento de validación.^{11, 49,50}

2.8. Uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución en la validación de métodos analíticos.

La cromatografía es una antigua técnica instrumental que ha evolucionado enormemente en los últimos años principalmente a partir de la década de los setenta, con lo que inicialmente concebida como método de separación ha llegado a convertirse en una fuente inagotable de métodos de análisis, pues pocos métodos de análisis químico son tan específicos para un analito en particular ya que los procedimientos cromatográficos son llevados a cabo en función del tipo de molécula.⁵⁸

El proceso cromatográfico contempla la separación de los componentes de una mezcla, para ello, una muestra de la mezcla (o el extracto de una muestra) es disuelta en una fase móvil (en este caso un líquido) y es impulsada a través de una fase inmóvil (fase estacionaria) que debe ser inmisible con ella, generalmente las fases son escogidas de tal forma que los componentes de las

muestras presenten diferencias en cuanto a sus propiedades físico-químicas (solubilidad, tamaño, fuerza iónica, polaridad, afinidad, etc.) para cada fase, las interacciones químicas entre la fase móvil y la muestra y entre la muestra y la fase estacionaria determinan el grado de migración y separación de los compuestos contenidos en una muestra, pues el componente que interactuó más con la fase estacionaria realizará un "viaje" más lento a través de ella que otro componente que tenga más interacción con la fase móvil y como resultado de estas diferencias entre la movilidad de los componentes de una muestra, estos se separarán uno de otro.⁵⁸⁻⁶⁰

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por las siglas en inglés de High Performance Liquid Chromatography) en fase reversa, es la técnica analítica más utilizada en el control de calidad e investigación, las razones de la preferencia de esta técnica se deben a su sensibilidad, a su fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, a su idoneidad para la separación de especies y a su gran aplicabilidad a sustancias químicas de interés tanto para la industria como para la ciencia además de que es sencilla, robusta y se puede realizar en la mayoría de laboratorios de análisis.^{53,58,59,61,62}

En esta técnica una mezcla de agua/solvente orgánico es comúnmente usada como fase móvil y un sólido de área de superficie altamente no polar es empleado como fase estacionaria, esta última es usualmente un empaque de alcanos adheridos a sílice (grupos alquilo de 8 o 18 carbonos recubriendo la superficie de sílice), la cromatografía en fase reversa es actualmente el método más popular de cromatografía en líquidos, pues más del 70 % de todas las separaciones por HPLC son llevadas a cabo por este método.^{59,60,62}

Sin embargo, la principal desventaja de esta técnica es que posee un costo inicial alto debido a la pureza y calidad de los disolventes que se utilizan así como por el tiempo que se invierte en desarrollar la metodología analítica, pues generalmente es tardada.⁶⁰ Los componentes básicos de un equipo de HPLC se describen a continuación y se muestran en la Figura 4:⁵⁸⁻⁶²

- **Bomba:** La misión de la bomba es la de suministrar un flujo constante y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna ya que el flujo puede variar por una obstrucción en las líneas de conducción por burbujas de aire, por sólidos presentes en la fase móvil, por el filtro de la cabeza de la columna, etc.
- **Inyector:** Es la parte del equipo por donde se introduce la muestra a analizar, un inyector ideal debe: introducir la muestra en la columna como una banda lo más estrecha posible, ser de fácil manejo y dar lugar a resultados reproducibles tanto en cantidad de muestra inyectada como en ensanchamiento que origina en la banda cromatográfica.
- **Columna:** Es el elemento fundamental de un equipo de HPLC puesto que es en ella donde tiene lugar la separación, por lo tanto resulta fundamental la correcta elección de la columna en cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad nunca se obtendrán buenos resultados aunque se disponga del mejor instrumental.
- **Horno para columna:** Su finalidad es proporcionar una temperatura adecuada para la columna, pues una termorregulación adecuada garantiza que la separación sea más eficiente y que el ensanchamiento que origina la banda cromatográfica sea reproducible.
- **Detector:** Es el dispositivo que permite medir a la salida de la columna la respuesta que genera a su paso la sustancia a analizar y se basa en un amplio rango de características físicas y químicas de la misma. Los detectores que más se emplean en la cromatografía de líquidos son los que miden la absorción de radiación Ultravioleta/Visible (UV/Vis) de una

sustancia a una determinada longitud de onda. Los datos de absorbancia se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.

- **Estación de datos:** Consta de un equipo de cómputo conectado a una interfaz y a un software específico que convierten la señal proveniente del detector en una señal gráfica que puede ser interpretada por el analista.

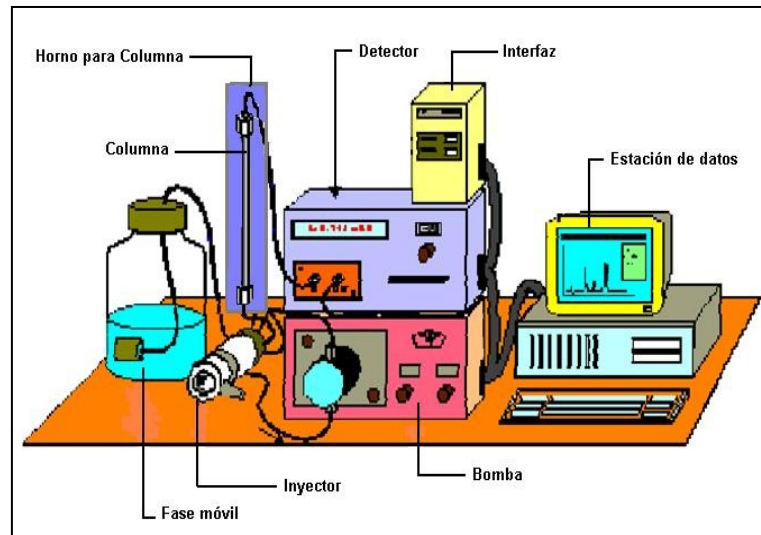


Figura 4. Componentes básicos de un equipo de HPLC.*

* Componentes básicos de un equipo de HPLC. Imagen tomada de: Hernández JM. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. *Ed Cont Lab Clín.* 2005; 8 (1):56. Modificada por: José Manuel Martín Gress.

III.- JUSTIFICACIÓN.

En los últimos años, investigadores de la UANL han desarrollado diversos sistemas nanoparticulados de liberación controlada a base de rifampicina, sistemas principalmente de administración oral que en teoría garantizan una máxima absorción del fármaco con el fin de mejorar la efectividad del tratamiento antituberculoso, a su vez, investigadores del Cuerpo Académico de Farmacia Clínica del Área Académica de Farmacia de la UAEH colaboran con los investigadores de la UANL realizando investigaciones dirigidas a la evaluación farmacocinética preclínica de estos nuevos sistemas con el objetivo de evaluar la eficacia de los mismos, por lo que es necesario contar con un método analítico que permita cuantificar *in vitro* la sustancia de interés antes de iniciar con la investigación *in vivo*. Este método analítico debe estar validado antes de ser empleado de manera rutinaria en el laboratorio, pues de esta forma se podrán interpretar los resultados obtenidos de manera correcta y asegurar que cumplen con los requerimientos de fiabilidad. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone desarrollar y validar un método analítico por HPLC que permita cuantificar *in vitro* rifampicina en plasma de rata Wistar con la finalidad de que el método pueda ser utilizado en la cuantificación de rifampicina durante la evaluación farmacocinética preclínica en rata Wistar de los sistemas nanoparticulados desarrollados en la UANL anteriormente mencionados.

IV.- HIPÓTESIS.

Si se valida un método analítico que permita cuantificar *in vitro* rifampicina en plasma de rata Wistar, entonces se garantizará que los resultados obtenidos tras su aplicación en la cuantificación de rifampicina durante la evaluación farmacocinética preclínica en rata Wistar de los sistemas nanoparticulados de liberación controlada a base de rifampicina llevada a cabo por los investigadores de la UANL y UAEH, son confiables.

V.- OBJETIVO GENERAL.

Validar un método analítico por HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar.

VI.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Estandarizar la metodología para la obtención de plasma de rata Wistar.
2. Determinar las condiciones cromatográficas para la validación del método analítico.
3. Determinar los parámetros de desempeño para la validación del método analítico.

VII.- METODOLOGÍA.

7.1. Metodología para estandarizar la obtención de plasma de rata Wistar.

Se trabajó con 40 ratas macho de la especie Wistar con un peso de 250 ± 10 gramos a las cuales se les tomó una muestra de sangre por punción cardíaca de acuerdo al siguiente procedimiento (Figura 5):⁶³⁻⁷⁴

- a) Se le administró a la rata una dosis de sulfato de atropina (0.04-0.10 mg/Kg) por vía subcutánea antes de ser anestesiada.
- b) Se colocó en un vaso de precipitados de 100 mL una torunda de algodón impregnada con 2 mL de éter etílico, luego se introdujo la cabeza de la rata en el vaso hasta que quedara anestesiada.
- c) Una vez anestesiada la rata se colocó en la mesa de laboratorio recostándola sobre su lado izquierdo y con la cabeza hacia el lado izquierdo del analista.
- d) Con la yema del dedo índice se palpó la caja torácica para localizar el sitio de punción (corazón) y con una aguja del número 20 acoplada a una jeringa precargada con 21 U.I. de heparina sódica se procedió a puncionar y extraer 3 mL de sangre.
- e) Después de haber extraído el volumen de sangre requerido, se examinó que la rata no tuviera daño físico, luego se regresó a su jaula y se dejó en un lugar ventilado hasta que recuperara el reflejo de estación.
- f) Las muestras de sangre obtenidas se vaciaron lentamente en tubos de ensaye de vidrio procurando que la sangre resbalara por la pared interna de los mismos para evitar que sufriera hemólisis.
- g) Los tubos de ensaye se colocaron en una centrifugadora Hettich[®] Rotofix 32 a 3500 r.p.m. por 10 minutos.
- h) Luego de esto se separó el sobrenadante obtenido y se depositó en otro tubo de ensaye para ser desnaturalizado con acetónitrilo (ACN)

agregando un volumen 1:1 en relación al volumen de plasma obtenido⁷⁵, enseguida esta mezcla se agitó en un vortex Daigger® Vortex-Genie 2 durante 2 minutos y luego se centrifugó a 4000 r.p.m. por otros 15 minutos.

- i) Después se separó el sobrenadante obtenido y se cargó en una jeringa de 10 mL, a esta última se le colocó un filtro de jeringa Acrodisc® (con poro de 0.2 µm de diámetro) para filtrar el plasma.
- j) El total de plasma desnaturalizado y filtrado se recolectó en frascos de vidrio con tapa hermética para ser utilizado en las próximas 6 horas.

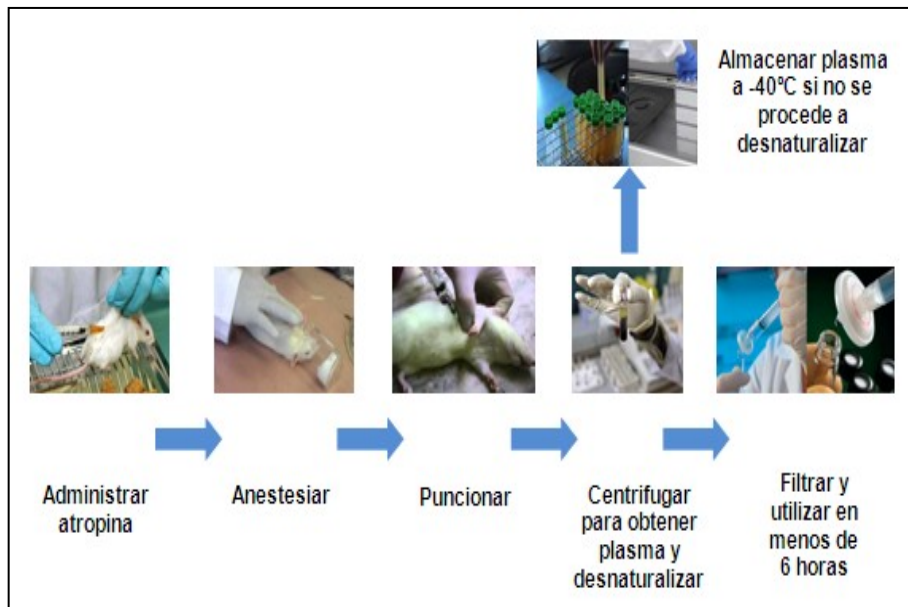


Figura 5. Metodología para la obtención de plasma de rata Wistar.*

* Metodología para la obtención de plasma de rata Wistar. José Manuel Martín Gress / Paint® 2007. 27 Mar 2013. Fotomontaje digital. Archivo del autor.

7.2. Metodología para determinar las condiciones cromatográficas del método analítico.

7.2.1. Características del equipo, material de laboratorio y reactivos.

Se empleó un sistema HPLC MERCK HITACHI® modelo L-6200A INTELLIGENT PUM acoplado a un Detector UV/Vis modelo L-7400 y a un Horno para columna modelo L-7300. Se utilizó una precolumna Thermo Scientific® de 10 mm de largo (L) X 2.1 mm de diámetro interno (DI) rellena de sílice con un tamaño de partícula de 5 µm y una columna Phenomenex® de 150 mm L X 4.6 mm DI rellena de sílice con un tamaño de partícula de 5 µm. El software que se usó para la recolección y procesamiento de la información fue EZstar® Chromatography Data System 7.7 y una interfaz Scientific Software International® SS42X. Se utilizaron tubos eppendorf (tubos de microcentrífuga) Eppendorf® y pipetas automáticas Eppendorf-Reference® previamente calibradas así como puntas para pipeta automática de la misma marca. El material de vidrio de laboratorio utilizado fue de la marca Pirex®. Se utilizó un estándar de RIF con un 97 % de pureza grado HPLC de la marca SIGMA-ALDRICH®, Butilhidroxitolueno (BHT) grado farmacéutico de Acofarma Distribución S.A., agua grado HPLC de la marca Ecopura®, acetonitrilo (ACN) grado HPLC de la marca Fermont®, ácido fosfórico grado analítico de la marca Reasol® y fosfato de potasio monobásico grado analítico de la marca J.T. Baker®.

7.2.2. Preparación de la solución de referencia.

Para preparar la solución de referencia de RIF (SRef-RIF), se pesaron 51.5464 mg de estándar de RIF (se consideró la pureza del reactivo) y 10 mg de BHT ⁷⁶⁻⁷⁸ en una balanza analítica Precisa® 92SM-202A cuya precisión es de 0.1 mg previamente calibrada y se disolvieron en un matraz

volumétrico de 10 mL con ACN, luego se colocó el matraz en un baño ultrasónico Branson[®] 510 durante 1 minuto, después se pasó 1 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 5 mL y se llevó a volumen de aforo con plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración final de 1000 µg/mL (Figura 6).

7.2.3. Determinación de las condiciones cromatográficas.

Con una jeringa HAMILTON[®] se inyectaron 25 µL de SRef-RIF en el cromatógrafo con la finalidad de encontrar el tiempo de retención (t_R), la temperatura del horno para la columna, la proporción de fase móvil y la velocidad de flujo más adecuados para obtener un cromatograma con un pico gaussiano sin señales de ruido y una línea base totalmente recta.

Se trabajó a una longitud de onda de 254 nm.⁷⁹ Las condiciones cromatográficas de partida fueron: ^{29, 80-83}

- Fase móvil: ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M (ajustado a pH 3.0 con ácido fosfórico) proporción 60:40 v/v.
- Temperatura del horno de la columna: 18 °C (temperatura ambiente local).
- Velocidad de flujo: 1 mL/min.

7.3. Metodología para determinar los parámetros de desempeño para la validación del método analítico.

El volumen de inyección fue de 25 µL, las muestras que se prepararon a partir de la SRef-RIF se agitaron en un vortex Daigger[®] Vortex-Genie 2 a velocidad 5 de agitación durante un minuto antes de ser inyectadas en el cromatógrafo. Todas las SRef-RIF y las muestras se protegieron de la luz y fueron preparadas y extraídas cada día de análisis (Figura 6).

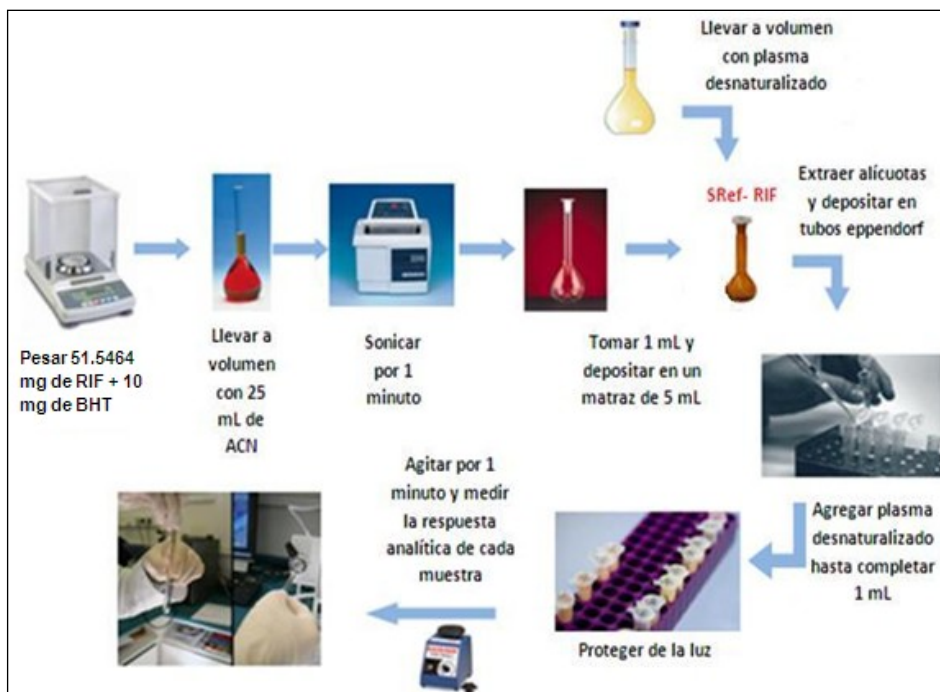


Figura 6. Proceso de elaboración de la SRef-RIF, de las muestras y de su análisis.*

Para los cálculos correspondientes y el análisis estadístico se utilizó Microsoft Excel[®] 2007 como software de apoyo.

Se determinaron los siguientes parámetros de desempeño: adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema, exactitud, repetibilidad, linealidad del método, reproducibilidad del método, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y estabilidad analítica de la muestra.^{49-53,56}

* Proceso de elaboración de la SRef-RIF, de las muestras y de su análisis. José Manuel Martín Gress / Paint[®] 2007. 27 Mar 2013. Fotomontaje digital. Archivo del autor.

7.3.1. Adecuabilidad del sistema.

Se preparó por sextuplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 µg/mL. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 500 µL de cada solución por separado y se les adicionó 500 µL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración final de 500 µg/mL, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Se calculó la media aritmética, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV). Con los resultados de los cromatogramas obtenidos se calculó el factor de retención (k), la resolución (R) y la eficiencia de la columna (N).

- ❖ Criterios de aceptación: el valor del CV deberá ser $\leq 2\%$, el valor de k deberá ser > 2 y el valor de R deberá ser > 2 .

7.3.2. Linealidad del sistema.

Se preparó por triplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 µg/mL. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 µL de cada solución por separado y se les adicionó 995, 990, 975, 950, 900, 750 y 500 µL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener muestras con una concentración final de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/mL, después se realizó la inyección de las 21 muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Se reportó la relación concentración Vs respuesta analítica, se determinó la ecuación de la recta ($y=mx + b$) y se calculó el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)). Finalmente, para comprobar la linealidad entre las curvas obtenidas se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

- ❖ Criterios de aceptación: el valor de r deberá ser ≥ 0.99 , el valor de r^2 deberá ser ≥ 0.98 , el valor del IC (β_1) no deberá incluir el cero y el valor calculado de F deberá ser $<$ que el valor crítico para F .

7.3.3. Exactitud y repetibilidad del método.

Se preparó por sextuplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 500 μL de cada solución por separado y se les adicionó 500 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Se determinó la cantidad recuperada de RIF y el porcentaje de recobro, con este último se calculó la media aritmética, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ)).

- ❖ Criterios de aceptación: el valor del CV deberá ser $\leq 2 \%$, el IC (μ) deberá incluir el 100 % y la media aritmética del porcentaje de recobro deberá estar en el intervalo 98-102 %.

7.3.4. Linealidad del método.

Se preparó por triplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 μL de cada solución por separado y se les adicionó 995, 990, 975, 950, 900, 750 y 500 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener muestras con una concentración final de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las 21 muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Se determinó la cantidad

recuperada de RIF y se reportó la relación concentración teórica Vs concentración recuperada, se determinó la ecuación de la recta ($y=mx + b$) y se calculó el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)), el intervalo de confianza para la ordenada al origen (IC (β_0)), el coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x}$), el porcentaje de recobro y el intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ)) del porcentaje de recobro. Finalmente, para comprobar la linealidad entre las curvas obtenidas se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

- ❖ Criterios de aceptación: el valor de r deberá ser ≥ 0.99 , el valor de r^2 deberá ser ≥ 0.98 , el valor del IC (β_1) deberá incluir a la unidad, el valor de IC (β_0) deberá incluir al cero, el valor del $CV_{y/x}$ deberá ser $\leq 2\%$, el IC (μ) deberá incluir el 100 %, la media aritmética del porcentaje de recobro deberá estar en el intervalo 98-102 % y el valor calculado de F deberá ser $<$ que el valor crítico para F.

7.3.5. Reproducibilidad del método.

Se preparó por triplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 500 μL de cada solución por separado y se les adicionó 500 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Las muestras se analizaron en dos días diferentes por dos analistas diferentes con los mismos instrumentos y equipos. Se calculó la media aritmética, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) de todas las muestras analizadas por ambos analistas en ambos días.

- ❖ Criterios de aceptación: el valor del CV deberá ser $\leq 2\%$.

7.3.6. Límite de detección y cuantificación.

Se preparó por triplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 1.5, 3 y 4.5 μL de cada solución por separado y se les adicionó 998.5, 997 y 995.5 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener muestras con una concentración final de 1.5, 3 y 4.5 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Se reportó la relación concentración Vs respuesta analítica, se determinó la ecuación de la recta ($y=mx + b$), se calculó el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de la regresión ($S_{Y/X}$), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC).

- ❖ Criterios de aceptación: el valor de r deberá ser ≥ 0.99 , el valor de r^2 deberá ser ≥ 0.98 , el $IC(\beta_1)$ no deberá incluir el cero.

7.3.7. Robustez.

Se preparó por triplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 500 μL de cada solución por separado y se les adicionó 500 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una a la condición cromatográfica determinada para el método y en seis diferentes condiciones cromatográficas que incluían ligeras variaciones en la temperatura del horno de la columna, en la velocidad

de flujo, en el pH de la fase móvil y en la proporción de los disolventes de la fase móvil. Se determinó en cada condición la cantidad recuperada de RIF y el porcentaje de recobro, después se calculó la media aritmética del porcentaje de recobro de las muestras analizadas a la condición cromatográfica determinada para el método (\bar{Y}_0) y la media aritmética del porcentaje de recobro de las muestras analizadas en cada condición cromatográfica diferente (\bar{Y}_i), por último se calculó la diferencia absoluta entre ambos valores ($|d_i| = \bar{Y}_i - \bar{Y}_0$).

- ❖ Criterios de aceptación: el valor de ($|d_i|$) deberá ser $\leq 2\%$.

7.3.8. Estabilidad analítica de la muestra.

En la determinación de este parámetro de desempeño se trabajó con tres condiciones de almacenaje diferentes:

- A. Se preparó por triplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 $\mu\text{g/mL}$ sin BHT. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 500 μL de cada solución por separado y se les adicionó 500 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Se determinó la cantidad de RIF recuperada y el porcentaje de recobro inicial de cada muestra, por último se almacenaron a temperatura ambiente con exposición a la luz directa.
- B. Se preparó por triplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 500 μL de cada solución por separado y se les adicionó 500 μL de plasma

desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración final de 500 µg/mL, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Se determinó la cantidad de RIF recuperada y el porcentaje de recobro inicial de cada muestra, por último se protegieron de la luz con papel aluminio y se almacenaron a temperatura ambiente.

- C. Se preparó por triplicado, por dilución y pesadas independientes SRef-RIF 1000 µg/mL. Posteriormente en tubos de microcentrífuga se depositaron alícuotas de 500 µL de cada solución por separado y se les adicionó 500 µL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración final de 500 µg/mL, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Se determinó la cantidad de RIF recuperada y el porcentaje de recobro inicial de cada muestra, por último se protegieron de la luz con papel aluminio y se almacenaron a una temperatura de 4 °C.

A las 6, 24, 48 y 72 horas después, todas las muestras de cada condición de almacenaje volvieron a ser inyectadas en el cromatógrafo y se determinó la cantidad recuperada de RIF y el porcentaje de recobro de cada una. Se calculó la media aritmética de los porcentajes de recobro del análisis inicial en cada condición de almenaje (\bar{Y}_0) y la media aritmética de los porcentajes de recobro después de los tiempos establecidos en cada condición de almacenaje (\bar{Y}_i). Finalmente se calculó la la diferencia absoluta entre ambos valores ($|d_i| = \bar{Y}_i - \bar{Y}_0$).

- ❖ Criterios de aceptación: el valor de ($|d_i|$) deberá ser ≤ 2 %.

VIII.- RESULTADOS.

8.1. Resultados de la estandarización de la obtención de plasma de rata Wistar.

Al extraer la cantidad de 3 mL de sangre en 40 ratas Wistar, se obtuvo un total de 103.6 mL de plasma ya desnaturalizado. La técnica de extracción por punción cardíaca no representó un riesgo mayor para las ratas por lo que después de un periodo de recuperación de 30 días se pudo tomar otra muestra de sangre a las mismas lo que evitó sacrificar un mayor número de estos animales. Las muestras de sangre obtenidas se mantuvieron a 4 °C y fueron procesadas dentro de las primeras 6 horas de su extracción y el plasma obtenido que no fue desnaturalizado se almacenó a -40 °C. Durante la realización de este trabajo de investigación se utilizó un total de 434.7 mL de plasma desnaturalizado de rata Wistar.

8.2. Resultados de la determinación de las condiciones cromatográficas del método analítico.

Las condiciones cromatográficas determinadas para el método analítico fueron:

- Fase móvil: ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M (ajustado a pH 2.27 con ácido fosfórico) proporción 61:39 v/v.
- Velocidad de Flujo: 1 mL/min.
- Temperatura del horno de la columna: 25 °C.
- Longitud de onda: 254 nm.
- Tiempo de retención: 1.400 minutos (general).

Con estas condiciones cromatográficas se estableció una línea base totalmente recta (Figura 7) y un cromatograma gaussiano resultado de la inyección de 25 μ L de SRef-RIF a los 1.423 minutos (Figura 8).

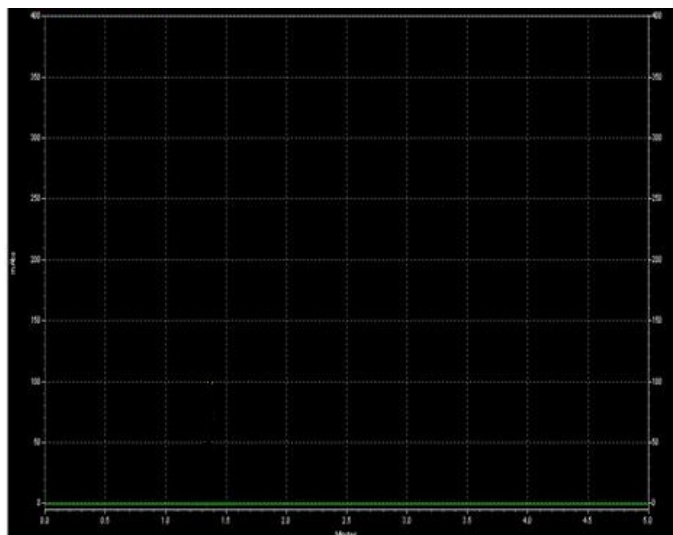


Figura 7. Línea base establecida a las condiciones cromatográficas determinadas.*

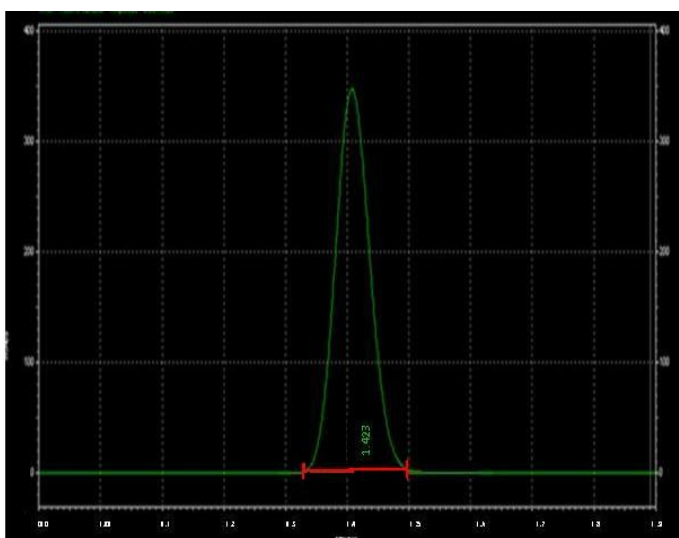


Figura 8. Cromatograma de una inyección de 25 μ L de SRef-RIF a las condiciones cromatográficas determinadas. **

* Línea base establecida a las condiciones cromatográficas determinadas. José Manuel Martín Gress / EZstar[®] 7.7. 27 May 2013. Captura de pantalla. Archivo del autor.

** Cromatograma de una inyección de 25 μ L de SRef-RIF a las condiciones cromatográficas determinadas. José Manuel Martín Gress / EZstar[®] 7.7. 27 May 2013. Captura de pantalla. Archivo del autor.

8.3. Resultados de la determinación de los parámetros de desempeño para la validación del método analítico.

8.3.1. Adecuabilidad del sistema.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la adecuabilidad del sistema, se calculó el valor de la media aritmética, S y CV para el área y la altura de los picos cromatográficos obtenidos. En la Tabla 2 se muestran los parámetros cromatográficos calculados para este parámetro de desempeño. De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos, se obtuvo un CV de 1.0281 % para el área y un CV de 1.1020 % para la altura, el valor calculado (Anexo 1) para k fue de 2.0102 y para R fue de 2.0229. La eficiencia de la columna (N) fue de 556.9600 platos teóricos y la altura de los platos teóricos (H) fue de 0.0269 cm.

Tabla 1. Adecuabilidad del sistema del método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar.

n	Concentración (µg/mL)	Área (mAbs)	Altura (Volts)	t _R (min)
1	500	4891654	1031234	1.441
2	500	4872263	1029876	1.450
3	500	4853961	1009567	1.452
4	500	4895379	1034256	1.451
5	500	4798342	1017736	1.445
6	500	4949648	1040123	1.442
Medidas estadísticas				
	Media	4876874.5	1027132	
	S	50140.7626	11319.7830	
	CV (%)	1.0281	1.1020	

Tabla 2. Parámetros cromatográficos obtenidos en la determinación de la adecuabilidad del sistema del método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar.

Parámetro	Resultado
k	2.0102
R	2.0229
N	556.9600 Platos Teóricos
H	0.0269 cm

8.3.2. Linealidad de sistema.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de la linealidad del sistema, se calculó el valor de r , r^2 e IC (β_1) para el área y la altura de los picos cromatográficos obtenidos. En la Tabla 4 se muestran los resultados de la ANOVA con el área de los picos obtenidos debido a que el valor de “ r ” y “ r^2 ” fue mayor en comparación con los de la altura. Las Figuras 9 y 10 muestran las curvas de calibración con la relación Concentración Vs Área y Concentración Vs Altura. De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos, se obtuvo un valor de $r > 0.99$ y $r^2 > 0.98$ tanto para el área y la altura de los picos, un IC (β_1) que no incluye al cero y un valor de F calculado $<$ al valor crítico para F en un nivel de confianza del 95 % entre 2 y 18 grados de libertad.

Tabla 3. Ensayo de linealidad del sistema del método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar.

Curva	n	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área (mAbs)	Altura (Volts)	t_R (min)
1	1	5	45012	10460	1.442
	2	10	95113	20928	1.451
	3	25	241567	52305	1.455
	4	50	482793	104661	1.442
	5	100	969708	209299	1.434
	6	250	2412748	523320	1.454
	7	500	4897884	1046610	1.448
2	8	5	44973	9875	1.452
	9	10	95518	21346	1.447
	10	25	243205	53412	1.449
	11	50	486164	109639	1.441
	12	100	971259	210567	1.449
	13	250	2441098	524769	1.413
	14	500	4880203	1023765	1.442
3	15	5	45104	11321	1.455
	16	10	94072	19984	1.431
	17	25	242516	52297	1.441
	18	50	483786	106549	1.452
	19	100	972902	211893	1.456
	20	250	2454769	527814	1.443
	21	500	4888019	1027395	1.452
Medidas estadísticas					
		r	0.9999	0.9998	
		r^2	0.9999	0.9998	
		IC (β_1)+	9805.73	2080.56	
		IC (β_1)-	9756.46	2054.24	

Tabla 4. ANOVA realizado con el área de los picos cromatográficos obtenidos.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Curva 1	7	9144825	1306403.5714	3.1844E+12		
Curva 2	7	9162420	1308917.1429	3.1721E+12		
Curva 3	7	9181168	1311595.4286	3.1878E+12		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Proabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	94375484.6484	2	47187742.3242	1.48E-05	0.999985	3.5546
Dentro de los grupos	5.7266E+13	18	3.1816E+12			
Total	5.7266E+13	20				

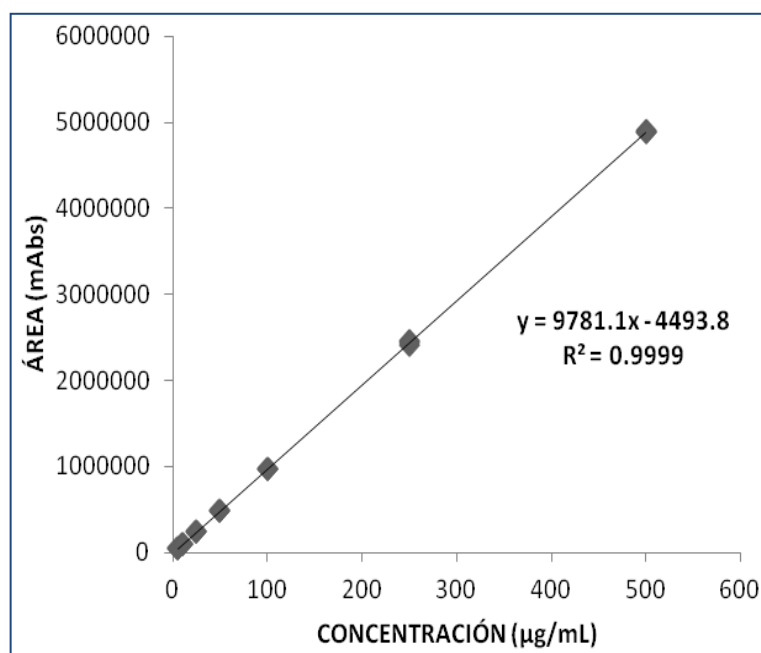


Figura 9. Curva de calibración Concentración Vs Área para la determinación de la linealidad del sistema.*

* Curva de calibración Concentración Vs Área para la determinación de la linealidad del sistema. José Manuel Martín Gress / Microsoft Excel® 2007 / Paint® 2007. 10 Oct 2013. Técnica digital. Archivo del autor.

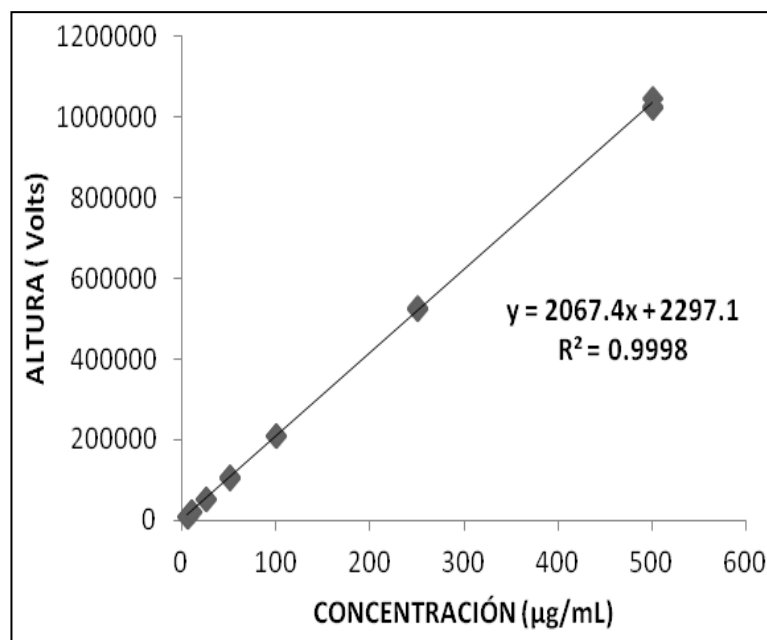


Figura 10. Curva de calibración Concentración Vs Altura para la determinación de la linealidad del sistema. **

8.3.3. Exactitud y repetibilidad del método.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la exactitud y repetibilidad del método. Para estos parámetros primero se determinó la cantidad de RIF recuperada con la ecuación ($y = mx + b$) de la curva de calibración de la Figura 9, luego se determinó el porcentaje de recobro y se calculó el valor de la media aritmética, S, CV e IC (μ). De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos, se obtuvo una media aritmética de 99.8123 % que está dentro del intervalo 98-102 %, un CV de 1.0272 % y un IC (μ) que incluye al 100 %.

** Curva de calibración Concentración Vs Altura para la determinación de la linealidad del sistema. José Manuel Martín Gress / Microsoft Excel® 2007 / Paint® 2007. 10 Oct 2013. Técnica digital. Archivo del autor.

Tabla 5. Exactitud y repetibilidad del método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar.

n	Concentración (µg/mL)	Área (mAbs)	C. Recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
1	500	4891654	500.5723	100.1145
2	500	4872263	498.5898	99.7179
3	500	4853961	496.7187	99.3437
4	500	4895379	500.9531	100.1906
5	500	4798342	491.0322	98.2064
6	500	4949648	506.5015	101.3003
Medidas estadísticas				
			Media	99.8123
			S	1.0253
			CV (%)	1.0272
			IC (µ)+	100.8883
			IC (µ)-	98.7361

8.3.4. Linealidad del método.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de la linealidad del método. Para este parámetro primero se determinó la cantidad de RIF recuperada y el porcentaje de recobro utilizando la ecuación ($y = mx + b$) de la curva de calibración de la Figura 9. Después se construyó una nueva curva de calibración con la relación Concentración teórica Vs Concentración recuperada (Figura 11) y se calculó el valor de r , r^2 , IC (β_1), IC (β_0) y $CV_{y/x}$. Con los porcentajes de recobro se calculó el valor de la media aritmética, S, CV e IC (μ). En la Tabla 7 se muestran los resultados de la ANOVA con los datos de concentración de RIF recuperada. De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos, se obtuvo un valor de $r > 0.99$, un $r^2 > 0.98$, un IC (β_1) que incluye a la unidad, un IC (β_0) que incluye al cero y un $CV_{y/x}$ de 0.7210 %; para el porcentaje de recobro se obtuvo una media aritmética de 100.4767 % que

está dentro del intervalo 98-102 %, un CV de 0.8100 % y un IC (μ) que incluye al 100 %. Por último, el valor de F calculado es < al valor crítico para F en un nivel de confianza del 95 % entre 2 y 18 grados de libertad.

Tabla 6. Ensayo de linealidad del método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar.

Curva	n	Concentración teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de recobro (%)
1	1	5	5.0614	101.2275
	2	10	10.1836	101.8360
	3	25	25.1568	100.6270
	4	50	49.81922	99.6385
	5	100	99.6004	99.6004
	6	250	247.1339	98.8536
	7	500	501.2093	100.2419
2	8	5	5.0574	101.1477
	9	10	10.2250	101.9800
	10	25	25.3242	101.2969
	11	50	50.1639	100.3277
	12	100	99.7590	99.7590
	13	250	250.0324	100.0130
	14	500	499.4016	99.8803
3	15	5	5.0708	101.4156
	16	10	10.0771	100.7717
	17	25	25.2538	101.0151
	18	50	49.9207	99.8415
	19	100	99.9269	99.9267
	20	250	251.4301	100.5720
	21	500	500.2007	100.0401
Medidas estadísticas				
		Media		100.4767
		S		0.8139
		CV (%)		0.8100
		CV _{Y/X} (%)	0.7210	
		r	0.9999	
		r ²	0.9999	
		IC (β_0)+	0.5654	
		IC (β_0)-	-0.5654	
		IC (β_1)+	1.0026	
		IC (β_1)-	0.9974	
		IC (μ)+		100.8500
		IC (μ)-		100.1095

Tabla 7. ANOVA realizado con los datos de concentración de rifampicina recuperada.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Curva 1	7	938.1646	134.0235	33285.6955		
Curva 2	7	939.9635	134.2805	33156.5155		
Curva 3	7	941.8802	134.5543	33321.0416		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.9865	2	0.4932	1.48E-05	0.99998	3.5546
Dentro de los grupos	598579.51	18	33254.417			
Total	598580.50	20				

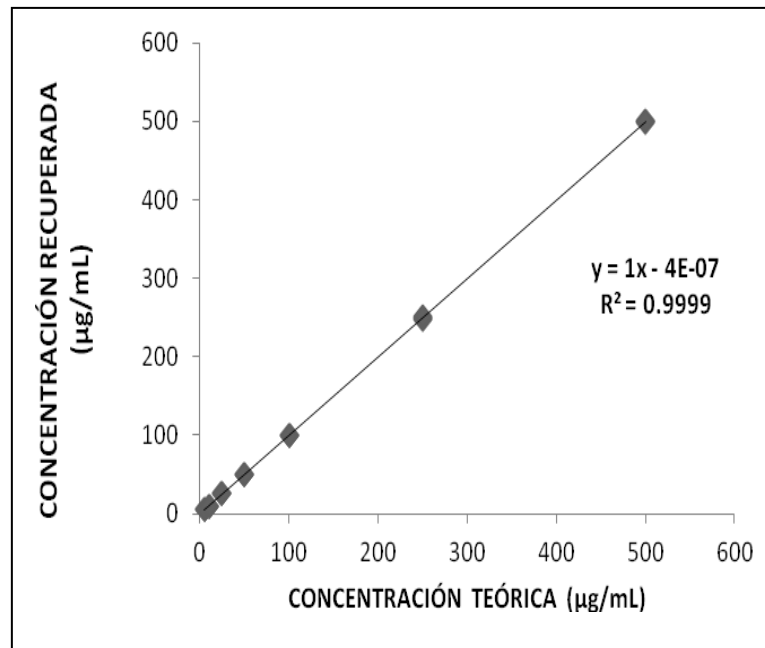


Figura 11. Curva de calibración Concentración teórica Vs Concentración recuperada para la determinación de la linealidad del método.*

* Curva de calibración Concentración teórica Vs Concentración recuperada para la determinación de la linealidad del método. José Manuel Martín Gress / Microsoft Excel® 2007 / Paint® 2007. 10 Oct 2013. Técnica digital. Archivo del autor.

8.3.5. Reproducibilidad del método.

La Tabla 8 contiene los datos obtenidos por 2 analistas diferentes en dos días diferentes utilizando el mismo método, instrumentos y equipo. En la Tabla 9 se muestra el valor calculado de la media aritmética, S y CV con el área, la altura y la concentración de RIF recuperada con los datos obtenidos por ambos analista en ambos días. De acuerdo al criterio de aceptación establecido, se obtuvo un CV de 1.7445 % para el área, un CV de 1.7429 % para la concentración de RIF recuperada calculada con el área, un CV de 1.7273 % para la altura y un CV de 1.7312 % para la concentración de RIF recuperada calculada con la altura. Para calcular la concentración de RIF recuperada se utilizó la ecuación ($y= mx+ b$) de las curvas de calibración de las Figuras 9 y 10.

Tabla 8. Registro de datos obtenidos por 2 analistas diferentes en 2 días diferentes para determinar la reproducibilidad del método.

		ANALISTA 1			ANALISTA 2		
		Área (mAbs)	Altura (Volts)	t _R (min)	Área (mAbs)	Altura (Volts)	t _R (min)
	n	DÍA 1			DÍA 1		
	1	4789184	994756	1.498	4981148	1020999	1.405
	2	4794122	999587	1.491	4853833	1011358	1.404
	3	4883674	1016034	1.499	4985817	1043132	1.401
M. E.	Media	4822326.66	1003459		4940266	1025163	
	S	53185.68	11154.9300		74889.57	16291.1300	
	CV (%)	1.1029	1.1100		1.5159	1.5900	
	n	DÍA 2			DÍA 2		
	1	4799967	999676	1.498	4885995	1016987	1.400
	2	4929679	1028123	1.499	5003366	1040976	1.402
	3	4788245	997471	1.497	4984634	1039100	1.403
M. E.	Media	4839297	1008423.33		4957998.33	1032354.33	
	S	78492.23	17095.9900		63056.18	13341.5600	
	CV (%)	1.6200	1.6900		1.2700	1.2900	

Tabla 9. Reproducibilidad del método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar.

	Área (mAbs)	Concentración recuperada (µg/mL)	Altura (Volts)	Concentración recuperada (µg/mL)
Analista 1, Día 1 y 2	4789184	490.0960	994756	480.0517
	4794122	490.6008	999587	482.3885
	4883674	499.7564	1016034	490.3439
	4799967	491.1984	999676	482.4315
	4929679	504.4599	1028123	496.1913
	4788245	490.0000	997471	481.3649
Analista 2, Día 1 y 2	4981148	509.7220	1020999	492.7454
	4853833	496.7056	1011358	488.0821
	4985817	510.1993	1043132	503.4511
	4885995	499.9937	1016987	490.8048
	5003366	511.9935	1040976	502.4083
	4984634	510.0784	1039100	501.5009
Medidas estadísticas				
Media	4889972	500.4003	1017349.9167	490.9804
S	85307.6257	8.7216	17572.3446	8.4997
CV (%)	1.7445	1.7429	1.7273	1.7312

8.3.6. Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

En la Tabla 10 se muestran los datos obtenidos en la determinación del Límite de Detección y Cuantificación. Para estos parámetros primero se determinó el valor de “r” para el área y la altura de los picos cromatográficos registrados, luego se construyó una curva de calibración con la relación Concentración Vs Área (Figura 12); se utilizó el área de los picos debido a que el valor de su “r” fue mayor en comparación con el de la altura. Posteriormente se calculó el valor de r^2 , m, $S_{Y/X}$ e IC (β_1) y de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos, se obtuvo un valor de $r > 0.99$, un $r^2 > 0.98$ y un IC (β_1) que no incluye al cero.

Con el valor de m y $S_{Y/X}$ se calculó el valor del Límite de Detección y del Límite de Cuantificación por el método de desviación estándar de la regresión (Tabla 11).⁵⁰

Tabla 10. Datos que se utilizaron en la determinación del Límite de Detección y del Límite de Cuantificación.

n	Concentración (µg/mL)	Área (mAbs)	Altura (Volts)	t _R (min)
1	1.5	10978	6757	1.440
2	1.5	11065	7012	1.450
3	1.5	10367	6356	1.442
4	3	24850	9477	1.438
5	3	25078	9657	1.400
6	3	25687	9715	1.450
7	4.5	39521	11987	1.443
8	4.5	41156	12550	1.451
9	4.5	39027	11593	1.441
Medidas estadísticas				
	r	0.9987	0.9904	
	r ²	0.9975		
	m	9699.3		
	S _{Y/X}	678.5232		
	IC (β ₁) +	10136.04		
	IC (β ₁) -	9262.55		

Tabla 11. Límite de Detección y Límite de Cuantificación del método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar.

LD = $(3.3 * S_{y/x}) / m$ (µg/mL)	0.2307
LC = $(10 * S_{y/x}) / m$ (µg/mL)	0.6996

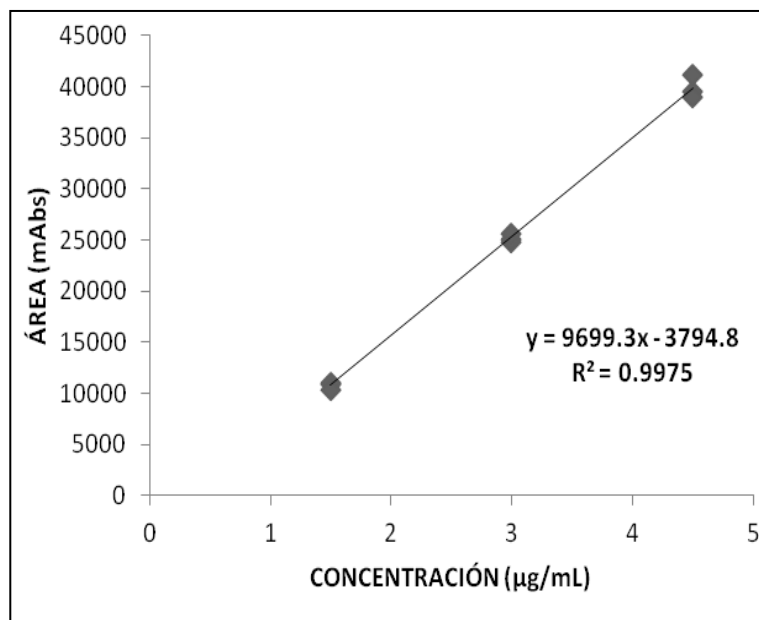


Figura 12. Curva de calibración Concentración Vs Área para calcular el Límite de Detección y el Límite de Cuantificación.*

8.3.7. Robustez.

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la robustez del método con los porcentajes de recobro de tres muestras de RIF analizadas a la condición cromatográfica determinada para el método y en seis condiciones cromatográficas diferentes, se recomienda revisar los Anexos 4, 5 y 6 para apreciar las diferencias en el área, altura, tiempo de retención y forma de los picos en cada condición cromatográfica. De acuerdo al criterio de aceptación establecido, el valor de $|d_i|$ fue $< 2 \%$ en las seis condiciones comatográficas diferentes.

* Curva de calibración Concentración Vs Área para calcular el Límite de Detección y el Límite de Cuantificación. José Manuel Martín Gress/ Microsoft Excel® 2007 / Paint® 2007. 27 Oct 2013. Técnica digital. Archivo del autor.

Tabla 12. Robustez del método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar.

Porcentajes de recobro en cada condición cromatográfica (%)								
n	Normal	T. 25°C,	T. 25°C,	T. 25°C,	T. 25°C,	T. 18°C,	T. 25°C,	
		flujo 1	flujo 1	flujo 1	flujo 1	flujo 1	flujo 1.5	
		mL/min	mL/min	mL/min	mL/min	mL/min	mL/min	
		y ACN:	y ACN:	y ACN:	y ACN:	y ACN:	y ACN:	
		SFPMB	SFPMB	SFPMB	SFPMB	SFPMB	SFPMB	
		pH 2.27	pH 2.27	pH 2.4	pH 2.0	pH 2.27	pH 2.27	
		(59:41)	(65:35)	(61:39)	(61:39)	(61:39)	(61:39)	
		(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
		(6)						
1	101.8503	100.0112	99.1930	104.0861	104.1834	101.8234	102.2859	
2	101.3887	99.1967	98.9851	103.4830	104.0702	101.3844	102.1658	
3	99.7033	97.7509	98.7796	101.3221	100.6884	100.2435	99.8096	
Medidas estadísticas	Media	100.9808	98.9863	98.9858	102.9637	102.9806	101.1504	101.4204
	d ₁ (%)	1.9945						
	d ₂ (%)	1.9950						
	d ₃ (%)	1.9829						
	d ₄ (%)	1.9998						
	d ₅ (%)	0.1696						
	d ₆ (%)	0.4396						

8.3.8. Estabilidad analítica de la muestra.

En las Tablas 13,14 y 15 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la estabilidad analítica de las muestras con RIF en tres condiciones diferentes de almacenaje. En la Tabla 13 se aprecia que las muestras de RIF almacenadas por 6 horas arrojaron un valor $|d_1| = 6.7292\%$ un resultado muy por encima del valor permitido por el criterio de aceptación, sin embargo su almacenamiento continuó por 18 horas más únicamente para conocer el grado de degradación de las muestras

después de 24 horas de almacenamiento. En la Tabla 14 se observa que las muestras se almacenaron por 24 horas debido a que el valor $|d_2| = 2.0256 \%$ era mayor al valor permitido por el criterio de aceptación. Por último, en la Tabla 15 se observa que las muestras se almacenaron hasta por 72 horas debido a que el valor $|d_4| = 2.1158 \%$ ya era mayor al valor permitido por el criterio de aceptación. Se sugiere revisar el Anexo 7 para apreciar las diferencias entre el área, la altura y la cantidad de RIF recuperada en cada condición de almacenaje, también se recomienda revisar el Anexo 8 para observar el producto de degradación de RIF en una muestra preparada sin BHT almacenada a temperatura ambiente y expuesta a la luz.

Tabla 13. Estabilidad analítica de las muestras de RIF almacenadas a temperatura ambiente, expuestas a la luz y preparadas sin BHT.

Porcentajes de recobro (%)				
n	Inicial (0)	6 hrs. (1)	24 hrs. (2)	
1	101.9347	94.1237	74.9653	
2	101.8317	93.9389	74.9779	
3	101.5053	94.0215	74.9094	
Medidas estadísticas				
Media	100.7572	94.0280	74.9509	
d_1 (%)		6.7292		
d_2 (%)			25.8063	

Tabla 14. Estabilidad analítica de las muestras de RIF almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Porcentajes de recobro (%)			
n	Inicial (0)	6 hrs. (1)	24 hrs. (2)
1	100.2578	99.7057	98.2130
2	100.0793	99.5886	98.0346
3	100.1537	99.6180	98.1662
Medidas estadísticas			
Media	100.1636	99.6374	98.1380
d ₁ (%)		0.5262	
d ₂ (%)			2.0256

Tabla 15. Estabilidad analítica de las muestras de RIF almacenadas a 4 °C y protegidas de la luz.

Porcentajes de recobro (%)					
n	Inicial (0)	6 hrs. (1)	24 hrs. (2)	48 hrs. (3)	72 hrs. (4)
1	101.8503	101.8478	101.5276	100.7078	98.9027
2	101.3887	101.1822	100.0413	100.6048	98.8645
3	99.7033	99.6419	99.3925	99.0516	98.8277
Medidas estadísticas					
Media	100.9808	100.8906	100.6538	100.1214	98.8650
d ₁ (%)		0.0902			
d ₂ (%)			0.3270		
d ₃ (%)				0.8594	
d ₄ (%)					2.1158

IX.- ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Con respecto a la estandarización de la metodología para la obtención de plasma de rata Wistar se puede comentar lo siguiente:

Para el proceso de la obtención de sangre por punción cardíaca en ratas Wistar una vez que se afinó la técnica, se logró que esta no representase un riesgo mayor para las ratas, por lo que después de darles un periodo de recuperación de 30 días como lo sugiere la bibliografía citada (65), las ratas estuvieron listas para una nueva extracción de sangre evitándose así el sacrificio innecesario de un mayor número de ratas Wistar. Al extraer 3 mL de sangre en 40 ratas Wistar se obtuvieron 103.6 mL de plasma ya desnaturalizado, en total se recolectaron 465.8 mL de plasma desnaturalizado de los cuales 434.7 mL se utilizaron en la validación del método analítico. El uso de sulfato de atropina para evitar la taquicardia, taquipnea e hipersecreción (63-65) provocados por el uso de éter etílico como anestésico, no provocó interferencia alguna en la calidad del plasma tanto en su obtención, como en su almacenamiento y durante su uso en la evaluación de los parámetros de desempeño. La cantidad de heparina sódica utilizada como anticoagulante (69-72) tampoco provocó interferencia alguna en la calidad del plasma. Para la obtención del plasma, las muestras de sangre se mantuvieron a 4 °C y fueron procesadas dentro de las primeras 6 horas de su extracción, la bibliografía cita que se pueden procesar antes de 24 horas de haber sido extraídas bajo esa misma temperatura y antes de 6 horas si se mantienen a temperatura ambiente (71-74), el plasma obtenido fue limpio, de color *sui generis* y libre de hemolisis. Toda muestra de sangre y plasma que no cumplió con estas condiciones fue desechada inmediatamente y cuando la extracción de sangre no se logró en el primer intento se descartó la toma de muestra con la finalidad de evitar daños físicos y estrés en la rata. El método para la obtención del plasma y su proceso de desnaturalización es laborioso, por lo que una vez obtenido el plasma se sugiere almacenarlo inmediatamente a -40 °C e ir descongelando y desnaturalizando solo el volumen necesario para llevar a

cabo la evaluación de cada parámetro de desempeño. Durante esta investigación, el plasma sin desnaturalizar se almacenó a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 meses aunque la bibliografía cita que el plasma se puede almacenar a esta misma temperatura hasta por 12 meses (71-74).

En cuanto a la determinación de las condiciones cromatográficas para la validación del método analítico se comenta lo siguiente:

Se partió de las siguientes condiciones cromatográficas (29, 79-83):

- Fase móvil: Acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M (ajustado a pH 3.0 con ácido fosfórico) en una proporción de 60:40 v/v.
- Velocidad de flujo: 1 mL/min.
- Longitud de onda: 254 nm.
- Temperatura del horno de la columna: Temperatura ambiente (la temperatura ambiente promedio registrada en el laboratorio de biofarmacia del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo fue de $18\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Sin embargo, el pH y la proporción de los disolventes de la fase móvil se modificaron en función a la línea base, ya que de acuerdo con la bibliografía citada, una línea base totalmente recta indica que la proporción de los disolventes de la fase móvil y la interacción entre la fase móvil y la fase estacionaria se encuentran en equilibrio (58, 60,62). El pH y la proporción de los disolventes de la fase móvil también se modificaron en función de la respuesta cromatográfica generada tras la inyección de 25 μL de SRef-RIF, pues con las condiciones de fase móvil anteriormente mencionadas no se obtenían picos ideales “gaussianos”, los picos estaban coleados, con señales de ruido y con un tiempo de retención muy largo (12 minutos). Por lo tanto la fase móvil se modificó hasta que se logró conseguir que la línea base fuera recta (Figura 7) y que los

picos fueran gaussianos (Figura 8); esta fase móvil quedó conformada por acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M ajustado a un pH de 2.27 en una proporción de 61:39 v/v, con esta nueva fase móvil el tiempo de retención para la rifampicina quedó establecido a los 1.400 minutos de manera general. Cabe mencionar que una de las metas de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución es obtener la mejor resolución posible en el menor tiempo posible (60). La longitud de onda se mantuvo en 254 nm debido a que es la longitud de onda que establece la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para la detección de rifampicina (79). Desde la búsqueda de la composición de la fase móvil, el horno de la columna se mantenía apagado y se trabajaba a temperatura ambiente, pero los tiempos de retención variaban desde 1.2 hasta 2 minutos (debido al pH y a la proporción de los disolventes), sin embargo, una vez determinada la composición de la fase móvil los tiempos de retención continuaban variando (desde 1.4 – 1.6 min) cada día de análisis a consecuencia de los cambios de temperatura en el ambiente conforme transcurría el día, por esta razón se decidió establecer una temperatura de 25 °C como temperatura fija de trabajo para el horno de la columna. De acuerdo con la bibliografía citada, una termorregulación adecuada garantiza que los tiempos de retención e inclusive el ancho de la base de los picos cromatográficos sean lo más posiblemente reproducibles (60,62). La velocidad de flujo se mantuvo en 1 mL/min y fue la única condición cromatográfica que no se modificó, una de las razones de esta decisión se debió a que en la bibliografía citada (80-83) se trabajaba con velocidades de flujo entre 1-1.5 mL/min y debido a que la velocidad de flujo que se utilizó desde un inicio se encontraba en este intervalo, se decidió no modificar dicha condición cromatográfica.

En lo que respecta a la determinación de los parámetros de desempeño para la validación del método analítico se puede comentar lo siguiente:

En la evaluación de la adecuabilidad del sistema (Tabla 1) se obtuvieron coeficientes de variación (CV) de 1.0281 % para el área y 1.1020 % para la

altura de los picos cromatográficos registrados, el criterio de aceptación para este parámetro de desempeño establece que el CV deberá ser $\leq 2\%$ (49,50-52,56). Por lo tanto, los resultados obtenidos cumplieron con el criterio establecido. En cuanto a los parámetros cromatográficos (Tabla 2), se obtuvo un valor para el factor de retención (k) de 2.0102 y un valor para la resolución (R) de 2.0229, el criterio de aceptación establece que el valor de ambos deberá ser > 2 , por lo tanto estos parámetros también cumplieron con el criterio establecido (49,50-52,56). El factor de retención (k) de una columna describe la velocidad de migración (elución) del analito a través de la columna y tiene relación con la composición de la fase móvil, la naturaleza del analito, el tiempo de retención y el ensanchamiento de los picos; de manera ideal, el factor de retención para un analito en una muestra debe estar entre 2 y 6, ya que si k fuera < 2 la elución ocurriría tan rápido que sería difícil determinar el tiempo de retención y si k fuera > 6 entonces la elución sería muy larga (58,59,60,62), de acuerdo con el valor de k obtenido en esta determinación, se concluye que la elución se lleva a cabo en un buen tiempo. La resolución (R) de una columna proporciona una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos y se relaciona con la composición de la fase móvil, el factor de retención y la eficiencia de la columna, el valor ideal de R es de 1.6, pero para la validación de un método cromatográfico se considera un valor de $R > 2$ (58, 59, 60,62), por lo tanto, se concluye que la separación de los analitos que ocurre dentro de la columna utilizada, es buena. La eficiencia de la columna (N) fue de 556.9600 platos teóricos con una altura para los platos teóricos (H) de 0.0269 cm. La eficiencia de una columna depende directamente de la velocidad del flujo, de la composición de la fase móvil, de la naturaleza del analito, del valor de k, del valor de R y principalmente de las características mismas de la columna como el tipo de empaque, el tamaño de partícula del empaque, del diámetro interno y de la distancia de la columna (58, 59, 60,62). Por todo lo anterior, se determina que el sistema HPLC posee adecuabilidad.

En la evaluación de la linealidad del sistema (Tabla 3) se obtuvo para las áreas registradas un valor de $r = 0.9999$, un valor de $r^2 = 0.9999$ y un IC (β_1) de 9756.46 a 9805.73; para las alturas registradas se obtuvo un valor de $r = 0.9998$, un valor de $r^2 = 0.9998$ y un IC (β_1) de 2054.24 a 2080.56. El criterio de aceptación establece un valor de $r \geq 0.99$, un valor de $r^2 \geq 0.98$ y un IC (β_1) que no incluya a la unidad (49,50-52,56), por lo tanto, los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación. También se demostró que las curvas de calibración construidas con el área y la altura de los picos (Figuras 9 y 10) poseen linealidad. Debido a que existe una proporción directa entre el área y la altura de los picos y que esto no representa un problema, se eligió utilizar la información de las áreas para realizar un análisis de varianza con la finalidad de comprobar la linealidad entre las curvas de calibración que se utilizaron en la determinación de este parámetro de desempeño. De acuerdo con el análisis de varianza realizado (Tabla 4), se obtuvo un valor de F calculado $<$ al valor crítico para F en un nivel de confianza del 95 % entre 2 y 18 grados de libertad. Esto significa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las curvas y que los resultados obtenidos son confiables (84-87). Por lo tanto, se determina que hay linealidad en el sistema.

En la evaluación de la exactitud y repetibilidad del método, se determinó para los porcentajes de recobro (Tabla 5) una media aritmética de 99.8123 %, un CV de 1.0272 % y un IC (μ) de 98.7361 a 100.8883 %. El criterio de aceptación establece un valor del CV ≤ 2 %, una media aritmética entre 98-102 % y un IC (μ) que incluya al 100 % (49,50-52,56), por lo tanto, los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación. Además, se pudo confirmar que los resultados obtenidos en estos parámetros de desempeño son fiables, debido a que se cumplieron los criterios de aceptación establecidos para los ensayos de la linealidad del sistema y del método. Por lo tanto, se demuestra que el método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar, posee exactitud y repetibilidad.

En la evaluación de la linealidad del método, se determinó para la concentración recuperada de rifampicina (Tabla 6) un valor de $r = 0.9999$, un valor de $r^2 = 0.9999$, un IC (β_1) de 0.9974 a 1.0026, un IC (β_0) de -0.5654 a 0.5654 y un $CV_{y/x}$ de 0.7210 %; para el porcentaje de recobro se determinó una media aritmética de 100.4767 %, un CV de 0.8100 % y un IC (μ) de 100.1095 a 100.8500 %. El criterio de aceptación establece un valor de $r \geq 0.99$, un valor de $r^2 \geq 0.98$, un IC (β_1) que incluya a la unidad, un IC (β_0) que incluya al cero, un $CV_{y/x} \leq 2$ %, un IC (μ) que incluya el 100 % y una media aritmética entre 98-102 % (49,50-52,56), por lo tanto, los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación. También se demostró que la curva de calibración construida con la relación Concentración teórica Vs Concentración recuperada (Figura 11) posee linealidad. Para comprobar la linealidad entre las curvas de calibración utilizadas en la determinación de este parámetro de desempeño, se realizó un análisis de varianza utilizando la concentración recuperada de rifampicina en cada curva. De acuerdo con el análisis de varianza realizado (Tabla 7), se obtuvo un valor de F calculado < al valor crítico para F en un nivel de confianza del 95 % entre 2 y 18 grados de libertad. Esto significa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las curvas y que los resultados obtenidos son confiables (84-87). Con todo esto, se demuestra que el método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar, posee linealidad.

En la evaluación de la reproducibilidad del método, se determinó que con dos analistas en dos días distintos (Tabla 9) se obtiene un CV de 1.7445 % con el área y un CV de 1.7273 % con la altura de todos los picos cromatográficos registrados. El criterio de aceptación para este parámetro de desempeño establece que el CV deberá ser ≤ 2 % (49,50-52,56), por lo tanto, los resultados anteriores cumplen con el criterio establecido. Además, los resultados de la Tabla 8 muestran con mayor claridad que las áreas y alturas de los picos registrados no variaron demasiado entre analista y día de análisis según los CV

obtenidos. Por consiguiente, se demuestra que el método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar, es reproducible.

En la determinación del Límite de Detección (LD) y del Límite de Cuantificación (LC) por el método de la desviación estándar de la regresión (50), el criterio de aceptación establece que el valor de r deberá ser ≥ 0.99 , que el valor de r^2 deberá ser ≥ 0.98 y que el IC (β_1) no deberá incluir el cero para poder garantizar que el valor de la pendiente (m) y el valor de la desviación estándar de la regresión ($S_{Y/X}$) son confiables para así poder calcular el LD y el LC (50). Se obtuvo (Tabla 10) un valor de $r = 0.9987$ para el área y un valor de $r = 0.9904$ para la altura de los picos cromatográficos registrados, como la “ r ” de las áreas es aún mayor que la “ r ” de las alturas, se eligió el área para construir una curva de calibración (Figura 12) que demostró poseer linealidad, se determinó un valor de $r^2 = 0.9975$ y un IC (β_1) de 9262.55 a 10136.04 por lo que los criterios de aceptación anteriormente mencionados se cumplieron. Finalmente se determinó el valor de m , de $S_{Y/X}$, el valor del LD y el valor del LC. Se calculó que el equipo de HPLC posee un LD= 0.2307 $\mu\text{g/mL}$ y un LC= 0.6996 $\mu\text{g/mL}$, lo que significa que se podrán detectar concentraciones de rifampicina $\geq 0.2307 \mu\text{g/mL}$ y cuantificar concentraciones de rifampicina $\geq 0.6996 \mu\text{g/mL}$.

En la determinación de la robustez del método, el criterio de aceptación establece que el valor de $|d_i|$ deberá ser $\leq 2 \%$ (49,50-52,56). En las seis condiciones cromatográficas diferentes a la condición cromatográfica determinada para el método se obtuvieron valores $< 2 \%$ (Tabla 12) cumpliéndose así, con el criterio de aceptación establecido. En el Anexo 6 se muestran los picos cromatográficos obtenidos en cada condición cromatográfica diferente, se puede apreciar que los picos están ligeramente coleados y que algunos tienen señales de ruido, sin embargo estos defectos no afectan a los resultados obtenidos, pues se demostró matemáticamente que el método analítico tiene la capacidad de mantenerse dentro del criterio de aceptación establecido al no verse afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en

las condiciones cromatográficas. Como dato adicional, se menciona que estas variaciones en las condiciones cromatográficas representan las máximas variaciones que se le pueden hacer al método sin que este pierda robustez. Por lo tanto, se demuestra que el método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar, posee robustez.

Finalmente, en la determinación de la estabilidad analítica de la muestra, el criterio de aceptación establece que el valor de $|d_i|$ deberá ser $\leq 2\%$ (49,50-52,56). Partiendo de esta premisa y con los resultados de la Tabla 13 se determina que una muestra de rifampicina preparada sin BHT (antioxidante), expuesta a la luz (fotólisis) y almacenada a temperatura ambiente, pierde más de un 6 % de su concentración inicial después de seis horas de almacenamiento bajo estas condiciones. Con los resultados de la Tabla 14 se determina que una muestra de rifampicina preparada con BHT, protegida de la luz y almacenada a temperatura ambiente, pierde un 2.0256 % de su concentración inicial después de 24 horas de almacenamiento bajo estas condiciones. Por último, con los resultados de la Tabla 15 se determina que una muestra de rifampicina preparada con BHT, protegida de la luz y almacenada a una temperatura de 4 °C, pierde un 2.1158 % de su concentración inicial después de 72 horas de almacenamiento bajo estas condiciones. Siendo más específicos con la interpretación de estos resultados, la estabilidad analítica de las muestras no presenta mayor complicación siempre y cuando se utilice un antioxidante y que las muestras se protejan perfectamente de la luz (natural o artificial), sin embargo, si estas dos condiciones no se cumplen, la estabilidad analítica de estas muestras se puede mantener dentro del criterio de aceptación si las muestras se analizan antes de 1 hora y 53 minutos de haber sido preparadas, esto según un cálculo aproximado basado en los resultados de la Tabla 13, también es importante señalar que este dato será de gran importancia para los próximos estudios farmacocinéticos preclínicos en rata Wistar de los que ya se ha venido hablando en esta tesis, pues una vez que se obtenga la muestra de sangre, los investigadores tendrán poco menos de 1 hora y 53

minutos para analizar la muestra antes de que la sustancia de interés (rifampicina) comience a degradarse. Por otro lado, la estabilidad analítica de las muestras con rifampicina (usando un antioxidante y protegiendo de la luz) dependerá de que su análisis se realice dentro de las primeras 24 horas de haber sido preparadas si se mantienen a temperatura ambiente y antes de 72 horas solo si se mantienen a una temperatura de 4 °C. Durante este trabajo de investigación todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente, se protegieron de la luz con papel aluminio, se mantuvieron en un lugar oscuro con luz roja y todas las muestras se analizaron entre 1-2 horas después de haber sido preparadas, además se utilizó BHT en una concentración de 0.02% (76-78) con respecto al volumen de la SRef-RIF. La razón del uso de este antioxidante, se debió a que no se disponía de ácido cítrico en el laboratorio para adicionarlo en la fase móvil como lo sugería la bibliografía 79,80 y 82, por lo que después de una búsqueda bibliográfica y considerando que se tenía al alcance BHT en el laboratorio, se decidió utilizar el BHT en la SRef-RIF con la concentración antes mencionada ya que el objetivo de utilizar un antioxidante (ya sea ácido cítrico, BHT o cualquier otro) es minimizar la degradación de la molécula por oxidación con la finalidad de garantizar que la cuantificación de RIF fuera lo más exacta posible.

X.- CONCLUSIONES.

Se estandarizó una metodología para la obtención de plasma de rata Wistar con la que se obtuvo un volumen de plasma considerable para la realización de esta validación, la calidad del plasma fue ideal sin complicaciones tanto en su obtención, como en su desnaturalización, en su almacenamiento y durante su uso en este trabajo. Además, la técnica empleada para la extracción de sangre no representó un riesgo mayor para las ratas por lo que fue posible extraerles otra muestra de sangre evitándose así, el sacrificio innecesario de un mayor número de ratas Wistar.

Las condiciones cromatográficas determinadas fueron las ideales para la detección y cuantificación de rifampicina, con estas condiciones se logró obtener picos gaussianos y tiempos de retención reproducibles, también se logró obtener una buena velocidad de elución y una buena separación según los valores de k y R obtenidos.

Con la determinación de los parámetros de desempeño y el cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos para cada uno, se determinó que el sistema de HPLC posee adecuabilidad y linealidad. Se determinó que la metodología es lineal, exacta, repetible, reproducible, robusta y que la estabilidad analítica de las muestras con rifampicina dependerá de la manipulación de factores como la luz, la oxidación y la temperatura. Por lo tanto, el método HPLC para la cuantificación *in vitro* de rifampicina en plasma de rata Wistar desarrollado y validado en laboratorio de biofarmacia del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, cumple con el objetivo para el cual fue diseñado.

XI.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Guzmán S, Salinas C, Castañeda G. La tuberculosis en México: aportaciones del Museo Anatomopatológico, 1895-1899. *Rev Inv Clín.* 2013; 65(1): 94-101.
2. Farga V. La conquista de la tuberculosis. *Rev Chil Enferm Respir.* 2004; 20(2): 101-108.
3. La Unión, 90 años de colaboración e innovación [online]. Francia- México: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias; 2010. [Fecha de consulta: 12 Ene 2014]. Disponible en: <http://www.union-imdp.org/files/90th%20broch%20Sp%20LR.pdf>
4. Torrico R. Breve recuerdo histórico de la tuberculosis. *Arch Boliv Hist Méd.* 2004; 10(1); 54:63.
5. Ledermann W. La tuberculosis después del descubrimiento de Koch. *Rev Chil Infect.* 2003; Edición de Aniversario: 48-50.
6. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis [online]. México: Diario Oficial de la Federación y Dirección General de Normas; 13 Nov 2013. [Fecha de consulta: 10 Dic 2013]. Disponible en: <http://200.77.231.100/work/normas/noms/2010/006ssa22013.pdf>
7. Raviglione MC, O'Brien RJ. Tuberculosis. En: Harrison Principios de Medicina Interna. 16^a Ed. U.S.A.: Mc Graw-Hill Interamericana; 2005. 2422-2490.
8. Organización Mundial de la Salud [home page on the Internet]. New York, U.E.A.; c2014 [Actualizado en Mar 2014; citado el 20 Abr 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
9. Olivera M, Luciani Giacobbe L, Ramírez Rigo M, Romañuk C. Desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada y administración oral para el tratamiento de la tuberculosis. *Rev Argent Salud Púb.* 2011; 2(9): 11-17.
10. Geetha G, Ganika Raju KN, Vignesh Kumar B, Gnana Raja M. Analytical Method Validation: An Updated Review. *IJAPBC.* 2012; 1(1): 64- 71.

11. Lumsden JH. Laboratory test method validation. *Revue Méd Vét.* 2004; 151 (7): 623-630.
12. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA. Mycobacterium. En: *Microbiología Médica.* 5ª Ed. España: Elsevier; 2006. 297-310.
13. Gorocica P, Jiménez MC, Garfías Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx.* 2005; 18 (2): 142-153.
14. Borrero R, Álvarez N, Reyes F, Sarmiento MA, Acosta A. Mycobacterium tuberculosis: factores de virulencia. *Vacci Monitor.* 2011; 20(1): 34-38.
15. Hernández PR, Mata D, Aguilar D, Orozco H. Factores inmunológicos que participan en la progresión de la tuberculosis pulmonar. *Mnsj Bioquim.* 2011; 35:1-16.
16. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández de Larrea C, Rivas-Santiago B. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. *Inv Clín.* 2008; 49 (3): 411-441.
17. Guía de practica clínica, Diagnostico y Tratamiento de Casos Nuevos de Tuberculosis Pulmonar [online]. México: Instituto Mexicano del Seguro Social; 2009. [Fecha de consulta: 3 Ago 2013]. Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/profesionales/guiasclinicas/Documents/070GER.pdf>
18. Juárez BM, Zaragoza VK, Criales CJL. Tuberculosis Pulmonar. *An Radiol Méx.* 2009; 4:319-329.
19. Fanlo P, Tiberio G. Tuberculosis extra pulmonar. *An Sist Sanit Navar.* 2007; 30 (2): 143-162.
20. Arciniegas W, Orjuela DL. Tuberculosis extra pulmonar: revisión de 102 casos, Hospital Universitario San Jorge de Pereira 2000-2004. *Bioméd.* 2006; 26 (1): 71-80.
21. Bermejo MC, Clavera I, Michel de la Rosa FJ, Marín B. Epidemiología de la tuberculosis. *An Sist Sanit Navar.* 2007; 30(2): 7-19.

22. Barrios JA, Castañón M, Flores MA, Hernández R. Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente. *Salud Púb Méx.* 2010; 52 (9): 70-78.
23. Boletín Epidemiológico: Tuberculosis en México [online]. México: Dirección General de Epidemiología y Secretaria de Salud; Mar 2012. [Fecha de consulta: 1 Ene 2013]. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2012/sem11/pdf/edit1112.pdf>
24. Situación actual de la Tuberculosis en el Mundo, México y Veracruz. Avances y desafíos [online]. México: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) y Secretaria de Salud; Mar 2012. [Fecha de consulta: 1 Ene 2013]. Disponible en: <http://web.ssaver.gob.mx/saludpublica/files/2012/03/01-SIMPOSIO-VERACRUZ.pdf>
25. Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2003; 21(6):299-308.
26. Arraiz N, Bermúdez V, Urdaneta B. Resistencia a drogas en *M. tuberculosis*: bases moleculares. *Arch Venez Farm Terap.* 2005; 24 (1): 1-15.
27. Flórez J, Mediavilla A, García-Lobo JM. Farmacología de las infecciones por micobacterias. En: *Farmacología humana*. 4ª Ed. España: Masson S.A.; 2003. 1157-1171.
28. Mehta JB, Shantaveerapa H, Byrd Jr RP, Morton SE, Fountain F, Roy T. Utilidad de la determinación de la concentración sanguínea de rifampicina en pacientes con respuesta lenta al tratamiento antituberculoso. *Rev Panam Salud Púb /Pan Am J Public Health.* 2002; 11(3): 186- 187.
29. Esquivel Rivero M, Cervantes Nevárez AN, Carrasco Portugal MC, Flores Murrieta FJ. Cuantificación de isoniazida, pirazinamida y rifampicina en plasma humano por HPLC y su aplicación en el monitoreo terapéutico en pacientes con tuberculosis [online]. En: *Memorias: XLIV Jornadas Médico-Quirúrgicas del INER "Tópicos de Actualidad en Medicina Respiratoria"*. México: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER); 12-14 Sep

2012. [Fecha de consulta: 1 Ago 2013]. Disponible en: http://www.iner.salud.gob.mx/descargas2/jornadas_medicos_libro.pdf
30. Alfaro MJ. Fármacos antituberculosos y antileproso. En: Velázquez Farmacología Básica y Clínica. 17^a Ed. España: Editorial Medica Panamericana; 2004. 859-869.
31. Brunten L. Quimioterapia de la tuberculosis, enfermedad por el complejo Mycobacterium y la Lepra. En: Goodman & Gilman manual de farmacología y terapéutica. 11^a Ed. México: Mc Graw-Hill; 2009. 784-797.
32. De la Iglesia AI, Morbidoni HR. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniazida en Mycobacterium tuberculosis: nueva información sobre viejos conocidos. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38: 97-109.
33. Plan mundial para Detener la tuberculosis 2006-2015 [online]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud y Alianza Alto a la Tuberculosis; 2006. [Fecha de consulta: 2 Jul 2013]. Disponible en: [http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/GPII_SPversion%20final e.pdf](http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/GPII_SPversion%20final%20e.pdf)
34. Santos JI, Franco C. Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES o DOTS) para tuberculosis en poblaciones con niveles moderados de farmacoresistencia: perspectiva del impacto internacional. *Rev Inv Clín.* 2005; 57(3): 488-490.
35. Lacy CF, Armstrong LL, Goldman MP, Lance LL. Manual de prescripción médica. 19^a Ed. EUA: Intersistemas; 2011. 1464-1466.
36. Vásquez Michel AM, Camacho M, Molina Orihuela J. Análisis bacteriológico y molecular de *Mycobacterium tuberculosis* rifampicina resistente aislados en siete regiones de Bolivia. *BIOFARBO.* 2011; 19(2): 21-27.
37. Calderón R, Asencios L, Quispe N, Custodio W, Montoya Y. Detección rápida de resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-SSCP y PCR-Heteroduplex. *Rev Peru Méd Exp Salud Púb.* 2003; 20 (2): 65-71.

38. Tostmann A, Boeree M, Aarnoutse R, De Lange W, Van der Ven A, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. *J Gastro and Hepato*. 2007; 23(1): 192-202.
39. Panchagnula R, Agrawal S. Biopharmaceutic and pharmacokinetic aspects of variable bioavailability of rifampicin. *Int J Pharm*. 2004; 271 (1): 1-4.
40. Sosa M, Széliga ME, Fernández A, Bregni C. Rifampicina y biodisponibilidad en productos combinados. *Ars Pharm*. 2005; 46 (4): 353-364.
41. Azarmi S, Roa W, Lobenberg R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Adv Drug Delivery Rev*. 2008; 60 (2): 863-875.
42. Ahmad Z, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Pharmacokinetic and pharmacodynamic behavior of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 27 (1): 409-416.
43. Gelperina S, Kisich K, Iseman MD. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 1: 172-187.
44. Pandey R, Zahoor A, Sharma S, Khuller GK. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis*. 2003; 83: 373-378.
45. Pandey R, Khuller GK. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. *J Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 54 (1): 266-268.
46. Hiremath PS, Saha RN. Oral matrix tablet formulations for concomitant controlled release of anti-tubercular drugs: Design and in vitro evaluations. *Int J Pharm*. 2008; 362 (1): 118-125.
47. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 83(5): 761-769.
48. Zhang J, Pornpattananangkul D, Huang CM. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr Med Chem*. 2010; 17 (1): 585-594.
49. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [online]. United States of America: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug

- Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM); Sep 2013. [Fecha de consulta: 1 Jul 2013]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>
50. Guía de validación de métodos analíticos [online]. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A. C.; 2002. [Fecha de consulta: 1 Jul 2013]. Disponible en: http://www.academia.edu/4513278/Guia_de_Validacion_de_metodos_analiticos_editada_por_QFB_de_México
51. Guideline on bioanalytical method validation [online]. England: European Medicines Agency; 21 Jul 2011. [Fecha de consulta: 20 Ago 2013]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
52. Quattrocchi OA, Abelaira de Andrizzi SI, Laba RF. Validación de métodos. En: Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica. 1ª Ed. Argentina. Artes Gráficas Farro SA; 1992. 302-328.
53. Alzate R. Validación de métodos analíticos [online]. Organización Panamericana de la Salud y la Red Panamericana para la Armonización de la Reglamentación Farmacéutica; 2012. [Fecha de consulta: 13 Ago 2013]. Disponible en: <http://www.uvg.edu.gt/DQF/Presentaciones-lunes-23-04-2012-Dra.Rosalba-Alzate/VALIDACION%20de%20M%C3%A9todos%20Fisicoquímicos%20RELABSA.pdf>
54. Eurofins Biolab S.L.U. Desarrollo y validación de métodos analíticos [online]. España: Eurofins Scientific; 2012. [Fecha de consulta: 4 Ago 2013]. Disponible en: [http://www.eurofins.es/media/2402058/bi-ct.07-esp%20%20desarrollo%20y%20validacion%20de%20m%C3%A9todos%20analiticos%20-%20biocidas%20v.4%20\(nov%202011\).pdf](http://www.eurofins.es/media/2402058/bi-ct.07-esp%20%20desarrollo%20y%20validacion%20de%20m%C3%A9todos%20analiticos%20-%20biocidas%20v.4%20(nov%202011).pdf)

55. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad [online]. México: Diario Oficial de la Federación y Dirección General de Normas; 20 Sep 1013. [Fecha de consulta: 21 Oct 2013]. Disponible en: <http://200.77.231.100/work/normas/noms/2010/177ssa12013.pdf>
56. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos [online]. México: Secretaria de Salud y Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura; 16 Feb 2011. [Fecha de consulta: 18 Ago 2013]. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfq032011.pdf>
57. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos [online]. Nueva York, U.E.A.: Naciones Unidas; 2010. [Fecha de consulta: 10 Oct 2013]. Disponible en: http://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Book_S.pdf
58. Hernández JM. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. *Ed Cont Lab Clín.* 2005; 8 (1):49-62.
59. Mukherjee A, Bera A. A detailed study of validation parameters and system suitability test in HPLC. *RJPBCS.* 2012; 3(4): 426- 447.
60. Quattrocchi OA, Abelaira de Andrizzi SI, Laba RF. Cromatografía. En: *Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica.* 1ª Ed. Argentina. Artes Gráficas Farro SA; 1992. 2-24.
61. Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) [online]. México: Centro Nacional de

- Metrología y Entidad Mexicana de Acreditación A.C.; May 2004. [Fecha de consulta: 15 Ago 2013]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CENAM:TrazabilidaddeincertidumbreenCGyCLAR_2000.pdf
62. Gelpí E. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromat.* 1995; 59 (1): 59-82.
63. Jekl V, Hauptman K, Jeklova E, Knotek Z. Blood sampling from de cranial vena cava in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Lab Anim.* 2005; 39: 236-239.
64. Manual para el manejo de animales con fines de experimentación y enseñanza [online]. México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; Enero 2010. [Fecha de consulta: 4 Sep 2013]. Disponible en: http://www.archivos.ujat.mx/dacbiol/docencia/lineamientos/manejo_animales.pdf
65. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Vorstenbosch CVD. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001; 21(1): 15-23.
66. Vanda- Cantón B. La experimentación bioética en animales en los códigos bioéticos. *Lab Acta.* 2003; 15 (2): 69-73.
67. De Aluja AS. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Méd Méx.* 2002; 138 (3): 295- 298.
68. NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [online]. México: Diario Oficial de la Federación y Dirección General de Normas; 22 Ago 2001. [Fecha de consulta: 1 May 2013]. Disponible en: <http://www.economia-noms.gob.mx/noms/detalleXNormaAction.do>
69. Ficha técnica: Heparina [online]. Madrid: Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad y Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; Jun 2009. [Fecha de consulta: 1 May 2013]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/56029/FT_56029.pdf

70. Monografía: Heparina sódica [online]. México: Facultad de Medicina UNAM y Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para farmacias y público en general; Jun 2005. [Fecha de consulta: 29 Abr 2013]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/91.HTM
71. Toma y envío de muestras al laboratorio, manual de procedimientos [online]. México: Laboratorio de diagnóstico Livexlab. [Fecha de consulta: 13 Abr 2013]. Disponible en: <http://www.livex.com.ec/uploads/documentos/Manual%20de%20Toma%20de%20muestras.pdf>
72. Guía para la toma de muestras [online]. Paraguay: Centro de Diagnóstico Veterinario “Prof. Dr. Antonio Rodríguez S.” y CEDIVEP Diagnóstico Veterinario S.R.L.; 2010. [Fecha de consulta: 5 Mar 2013]. Disponible en: <http://www.CEDIVEP/guias/veterinaria/toma de muestras/.pdf>
73. Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos [online]. México: Diario Oficial de la Federación y Dirección General de Normas; 26 Oct 2012. [Fecha de consulta: 10 May 2013]. Disponible en: <http://200.77.231.100/work/normas/noms/2010/253ssa12012.pdf>
74. Guía para el uso clínico de la sangre [online]. México: Secretaria de salud, Asociación Mexicana de Medicina Transfusional A. C. y Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología A. C.; Enero 2004. [Fecha de consulta: 10 AGO 2013]. Disponible en: <http://www.ammtac.org/docs/guiastransfusion/guiaparaelusoclinicodelasangre.pdf>
75. Quattrocchi OA, Abelaira de Andrizzi SI, Laba RF. Desnaturalización. En: Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica. 1ª Ed. Argentina. Artes Gráficas Farro SA; 1992. 124-127.
76. Ficha de información técnica Butilhidroxitolueno [online]. México: Acofarma Distribución S.A.; 1010. [Fecha de consulta: 2 May 2013]. Disponible en: <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4421->

e95950815135309a3ec3e662814572e4644c2695/main/files/Butilhidroxitolueno__BHT_.pdf

77. Ficha de datos de seguridad: Butilhidroxitolueno [online]. Chile: Laboratorios Merck; 2 Jul 2007. [Fecha de consulta: 5 Jun 2013]. Disponible en: file:///C:/Documents%20and%20Settings/Intel/Mis%20documentos/Downloads/817074_ES_CL.PDF
78. Campos J, Ruíz R, Díaz E. Efecto sinérgico del butil-hidroxi-tolueno (BHT) y ácido ascórbico en un producto cereal lacteado. *Rev Amazon Inv Alim.* 2002; 2(1): 89-95.
79. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9ª Ed. 2008.1239-1240.
80. Hemmanth AK, Chandra I, Geetha R, Silambu K, Lalitha V, Prema G. A validated high-performance liquid chromatography method for the determination of rifampicin and desacetyl rifampicin in plasma and urine. *Indian J Pharmacol.* 2004; 36(4): 231-233.
81. Tatarczak M, Flieger J, Szumilo H. High Performance Liquid Chromatography determination of rifampicin in complex pharmaceutical preparation and in serum mycobacterium tuberculosis-infected patients. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research.* 2005; 62(4): 251-256.
82. Liu J, Sun J, Zhang W, Gao K, He Z. HPLC determination of rifampicin and related compounds in pharmaceuticals using monolithic column. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2008; 46(1): 405–409.
83. Moreno-Exebio L, Grande-Ortiz M. Validación de un método de Cromatografía Líquida para la determinación de rifampicina en plasma humano. *Rev Peru Méd Exp Salud Púb.* 2014; 31(1): 56-61.
84. Mora CP, Tello ME, Martínez F. Validación de una metodología analítica para la cuantificación de naproxeno en estudios de reparto líquido/líquido mediante espectrofotometría ultravioleta. *Rev Col Cienc Quím Farm.* 2006; 35 (1): 81-105.
85. Contreras J, Jardines Y, Fonseca M, Águila B. Validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación del principio activo en tabletas de Controfilina- 200. *Rev CENIC Cienc Quím.* 2005; 36 (2): 74-81.

86. Montes F. Análisis de la varianza ANOVA [online]. España: Departamento de Estadística, Universidad de Valencia; 2004. [Fecha de consulta: 25 Jun 2014]. Disponible en: <http://www.uv.es/montes/biomecanica2004/anova.pdf>
87. Díaz J. Guía Práctica del Curso de Bioestadística Aplicada a las Ciencias de la Salud [online]. España: Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad, Hospital Universitario de Ceuta e Instituto Nacional de Gestión Sanitaria; 2011. [Fecha de consulta: 26 Jun 2014]. Disponible en: http://www.ingesa.msssi.gob.es/estadEstudios/documPublica/internet/pdf/Guia_Practica_Bioestadistica.pdf
88. Jurado JM. Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos. *Talanta*. 2008; 63(1): 1-47.
89. Guía para la elaboración de citas y referencias bibliográficas, según el estilo Vancouver [online]. Perú: Universidad de Piura; 2011. [Fecha de consulta: 3 May 2014]. Disponible en: <http://www.biblioteca.udep.edu.pe/wp-content/uploads/2011/02/Guia-ElabCitas-y-Ref-Estilo-Vancouver.pdf>
90. Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE). Requisitos de uniformidad para manuscritos enviados a revistas biomédicas: Redacción y preparación de la edición de una publicación biomédica [online]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 30 Jul 2012. [Fecha de consulta: 3 May 2014]. Disponible en: http://www.metodo.uab.cat/docs/Requisitos_de_Uniformidad.pdf
91. Manual para la elaboración de tesis y trabajos de investigación [online]. Puebla, México: Universidad Politécnica Hispano Mexicana; 20 Ago 2009. [Fecha de consulta: 5 May 2013]. Disponible en: <http://www.uphm.edu.mx/manuales/Manual-para-elaboracion-de-tesis-y-trabajos-de-investigacion.pdf>

XII.- ANEXOS.

Anexo 1. Determinación de los parámetros cromatográficos.

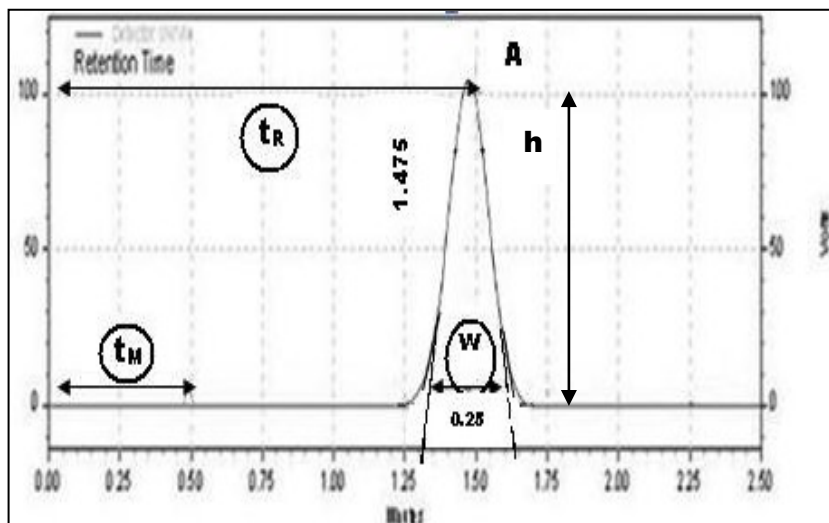


Figura 13. Elementos de un pico cromatográfico.*

Simbología	
H	Altura del plato (cm)
h	Altura del pico (Volts)
L	Longitud de la columna (cm)
W	Ancho de la base del pico (min)
t_M	Tiempo muerto (min)
t_R	Tiempo de retención (min)

Parámetros cromatográficos	Fórmula	Resultado
Factor de capacidad	$k = (t_R - t_M) / t_M$	2.0102
Resolución	$R = 2(t_{RB} - t_{RA}) / W_A + W_B$	2.0229
Eficiencia de la columna	$N = 16 (t_R / W)^2$	556.9600 Platos Teóricos
Altura del Plato Teórico	$H = L / N$	0.0269 cm

Nota: Para calcular R, $t_{RB}=1.121$ min y $W_B= 0.1$ min de acuerdo con los datos del cromatograma del Anexo 7.

* Elementos de un pico cromatográfico. José Manuel Martín Gress / Paint© 2007. 13 Dic 2013. Técnica digital. Archivo del autor.

Anexo 2. Metodología para preparar la fase móvil.

Reactivos:

Acetonitrilo grado HPLC (Fermont [®])	1 Litro
Agua grado HPLC (Ecopura [®])	1 Litro
Fosfato de potasio monobásico grado analítico (J.T. Baker [®]).	7 gramos
Ácido fosfórico grado analítico (Reasol [®])	8 mL
Standard Buffer 4.01 pH (Macron Fine Chemicals [®])	5 mL
Standard Buffer 7.0 pH (Macron Fine Chemicals [®])	5 mL

Materiales:

3	Matraz de kitasato (Pirex [®]) de 1 Litro
3	Matraz Erlenmeyer (Pirex [®]) de 1 Litro
2	Vaso de precipitado (Pirex [®]) de 1 Litro
1	Matraz volumétrico (Pirex [®]) de 1 Litro
2	Probeta graduada (Pirex [®]) de 1 Litro
1	Vidrio de reloj
1	Espátula de acero inoxidable
1	Pipeta graduada (Pirex [®]) de 10 mL
1	Bomba de vacío (Felisa [®] 1500)
1	Baño ultrasónico (Aquasonic [®])
1	pHmetro (CORNING [®] 7)
1	Balanza analítica (Precisa [®] 92SM-202A)
1	Equipo para filtrado al vacío (Kimax [®])
2	Filtros de nylon 0.45 µm diámetro (Merck Millipore [®])
2	Filtros de celulosa 0.45 µm diámetro (Merck Millipore [®])
1	Rollo de papel parafilm (AMERICAN CAN [®])

PROCEDIMIENTO:

● Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (Figura 14):

1. Calibrar el pHmetro con el Standar Buffer pH 7.0 y luego con el Standar Buffer pH 4.01.
2. Pesar 6.8181 g de fosfato de potasio monobásico y agregarlo a un matraz volumétrico de 1 L.
3. Adicionar 0.5 L de agua HPLC y disolver perfectamente.
4. Agregar 7.2 mL de ácido fosfórico y llevar al volumen de aforo con agua HPLC.
5. Vaciar la solución en un vaso de precipitados de 1 L, medir el pH y ajustarlo a pH 2.27 con ácido fosfórico.
6. Filtrar la solución al vacío utilizando un filtro de celulosa de 0.45 μm .
7. Vaciar a un matraz Erlenmeyer y desgasificar en baño ultrasónico por 15 minutos.
8. Sellar perfectamente el matraz Erlenmeyer con papel parafilm.

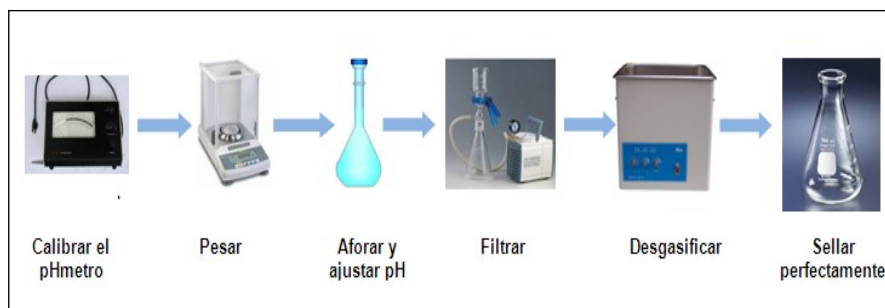


Figura 14. Preparación de la solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27.*

* Preparación de la solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27. José Manuel Martín Gress / Paint© 2007. 3 Nov 2013. Fotomontaje digital. Archivo del autor.

● **Acetonitrilo (Figura 15):**

1. Filtrar al vacío 1 L de ACN utilizando un filtro de nylon de 0.45 μm .
2. Vaciar a un matraz Erlenmeyer y desgasificar por 15 minutos.
3. Sellar perfectamente el matraz Erlenmeyer con papel parafilm.

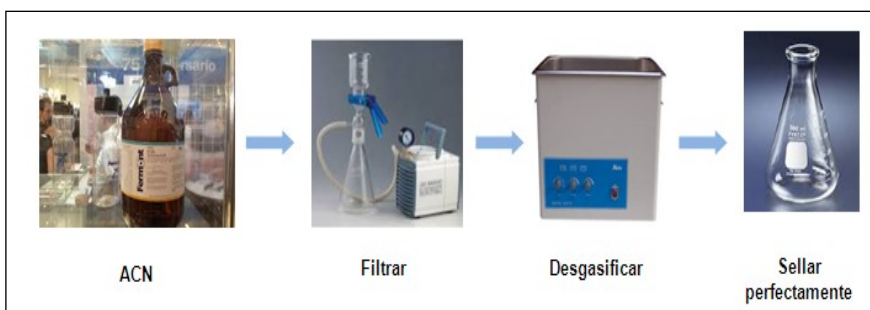


Figura 15. Filtración y desgasificación de ACN.**

Preparación de la Fase Móvil:

1. Mezclar en un matraz Erlenmeyer 690 mL de Acetonitrilo y 390 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M ajustado a pH 2.27 para obtener una relación 61:39 v/v.
2. Filtrar al vacío la mezcla utilizando un filtro de nylon de 0.45 μm y después desgasificar por 10 minutos.
3. Sellar perfectamente con papel parafilm y utilizar a temperatura ambiente o en su caso almacenar a 4 °C.
4. Si la fase móvil se almacena a 4 °C, se deberá desgasificar por 20 minutos a temperatura ambiente antes de ser utilizada en el cromatógrafo.

** Filtración y desgasificación de ACN. José Manuel Martín Gress / Paint® 2007. 3 Nov 2013. Fotomontaje digital. Archivo del autor.

Anexo 3. Fórmulas utilizadas.

SUMATORIA DE X	ΣX
SUMATORIA DE Y	ΣY
SUMATORIA DE X ²	ΣX^2
SUMATORIA DE Y ²	ΣY^2
SUMATORIA DE XY	ΣXY
NÚMERO DE EVENTOS	n
MEDIA ARITMÉTICA	$\Sigma y/n$ $\Sigma x/n$
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	$S = ((n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2) / (n/n-1))^{1/2}$
DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA REGRESIÓN	$S_{y/x} = ((\Sigma y^2 - m\Sigma xy - b\Sigma y) / n-2)^{1/2}$
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	$CV = (S/\Sigma X/n) \times 100$
COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE REGRESIÓN	$CV_{x/y} = (S_{y/x} / (\Sigma y/n)) (100)$
PENDIENTE	$m = (\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y) / (n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2)$
ORDENADA AL ORIGEN	$b = (\Sigma x^2 \Sigma y_i - \Sigma x_i y_i) / (N \Sigma x^2 - (\Sigma x_i)^2)$
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	$r = n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y) / ((n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2)(n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2))^{1/2}$

COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	$r^2 = (n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2 / (n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)$
INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE	$IC(\beta_1) = m \pm t_{0.975, n-2} S_{m1}$ $S_{m1} = S_{y/x} (1 / \sum x^2 - ((\sum x)^2 / n))^{1/2}$ $S_{y/x} = ((\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y) / n - 2)^{1/2}$
INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA POBLACIONAL	$IC(\mu) = (\sum y / n) \pm t_{0.975, n-1} (s / (n)^{1/2})$
INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN	$IC(\beta_0) = b \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$ $S_{b0} = S_{y/x} ((1/n) + (Z^2 / \sum x^2 - ((\sum x)^2 / n)))^{1/2}$ $Z = \sum x / n$
MEDIA ARITMÉTICA DE LA CONDICIÓN NORMAL	$\hat{Y}_0 = \sum y_0 / n_0$
MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN DIFERENTE A LA CONDICIÓN NORMAL	$\hat{Y}_i = \sum y_i / n_i$
DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN RESPECTO DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE LA CONDICIÓN NORMAL	$ d_i = \hat{Y}_i - \hat{Y}_0 $
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	$LC = (10 * S_{y/x}) / m$
LÍMITE DE DETECCIÓN	$LD = (3.3 * S_{y/x}) / m$
EFICIENCIA DE LA COLUMNA	$N = 16 (t_R / W)^2$; $N = L / H$
FACTOR DE RETENCIÓN	$k = (t_R - t_M) / t_M$
RESOLUCIÓN	$R = 2(t_{RB} - t_{RA}) / W_A + W_B$
MOLARIDAD	$M = n / V$; $M = g / VPM$
pH	$pH = -\log[H^+]$

Anexo 4. Datos registrados de tres muestras de rifampicina analizadas a la condición cromatográfica determinada para el método.

Concentración (µg/mL)	n	Área (mAbs)	Altura (Volts)	t _R (min)	Concentración recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
500	1	4976548	1029876	1.475	509.2517	101.8503
	2	4953975	1025674	1.4751	506.9439	101.3887
	3	4871546	1012765	1.473	498.5165	99.7033

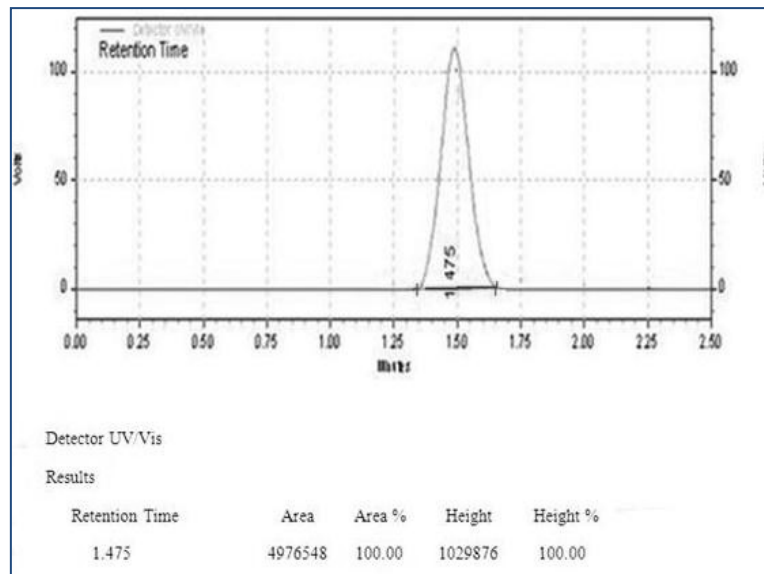


Figura 16. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a la condición determinada para el método.*

* Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a la condición determinada para el método. José Manuel Martín Gress / EZstar® 7.7 / Paint® 2007. 9 Nov 2013. Imagen escaneada. Archivo del autor.

Anexo 5. Datos de área, altura y tiempo de retención de una muestra de 500 µg/mL de rifampicina analizada en seis diferentes condiciones cromatográficas.

Condición cromatográfica	n	Área (mAbs)	Altura (Volts)	t _R (min)	Concentración recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
F. Móvil ACN: SFPMB pH 2.27 (59:41), 25°C y 1mL/min	1	4846772	109758	1.592	495.9836	99.1967
	2	4886602	101800	1.589	500.0558	100.0112
	3	4776064	104429	1.591	488.7546	97.7509
	Media					98.9863
F. Móvil ACN: SFPMB pH 2.27 (65:35), 25°C y 1mL/min	1	4846593	1489872	1.350	495.9654	99.1930
	2	4836423	1472587	1.340	494.9256	98.9851
	3	4826371	1487578	1.310	493.8979	98.7796
	Media					98.9858
F. Móvil ACN: SFPMB pH 2.4 (61:39), 25°C y 1mL/min	1	5056398	531799	2.367	517.4154	103.4830
	2	5085887	532021	2.328	520.4303	104.0861
	3	4950714	546069	2.352	506.6105	101.3221
	Media					102.9637
F. Móvil ACN: SFPMB pH 2.0 (61:39), 25°C y 1mL/min	1	5090649	856745	1.424	520.9172	104.1834
	2	5085112	872879	1.420	520.3511	104.0702
	3	4919723	885974	1.422	503.4420	100.6884
	Media					102.9806
F. Móvil ACN: SFPMB pH 2.27 (61:39), 18°C y 1mL/min	1	4975231	1033684	1.672	509.1171	101.8234
	2	4953763	1029396	1.670	506.9222	101.3844
	3	4897963	1046768	1.674	501.2173	100.2435
	Media					101.1504
F. Móvil ACN: SFPMB pH 2.27 (61:39), 25°C y 1.5 mL/min	1	4997848	1029876	1.477	511.4294	102.2859
	2	4991975	1025674	1.471	510.8289	102.1658
	3	4876746	1012765	1.475	499.0481	99.8096
	Media					101.4204

Anexo 6: Cromatogramas de una muestra de 500 µg/mL de rifampicina analizada en seis diferentes condiciones cromatográficas.

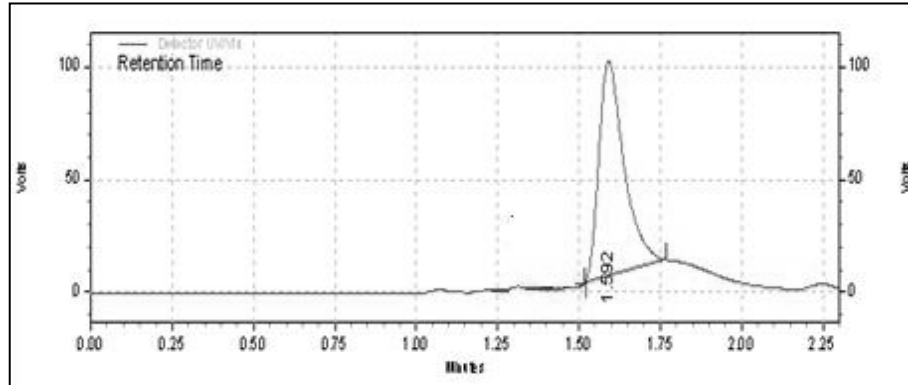


Figura 17. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a 25 °C, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil de ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (59:41).*

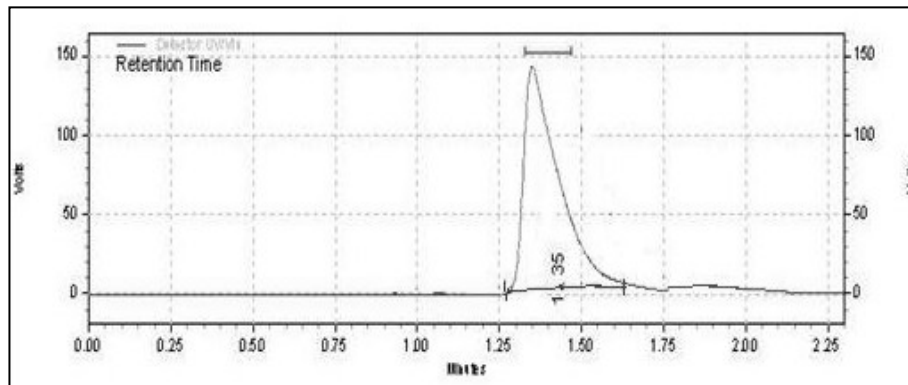


Figura 18. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a 25 °C, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil de ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (65:35). **

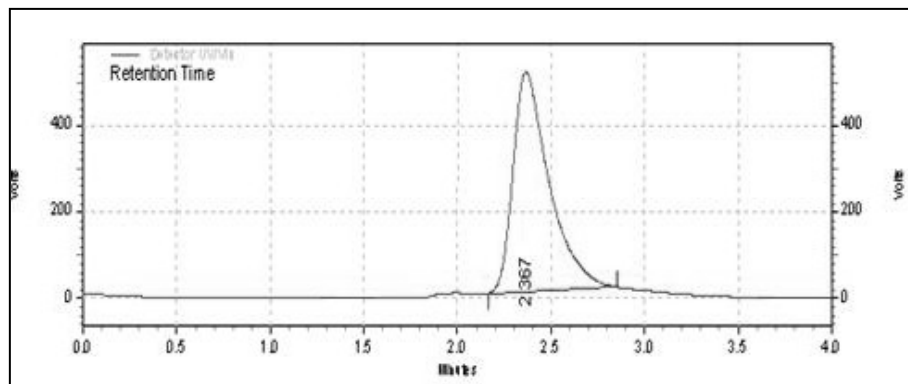


Figura 19. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF analizada a 25 °C, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil de ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.4 (61:39). ***

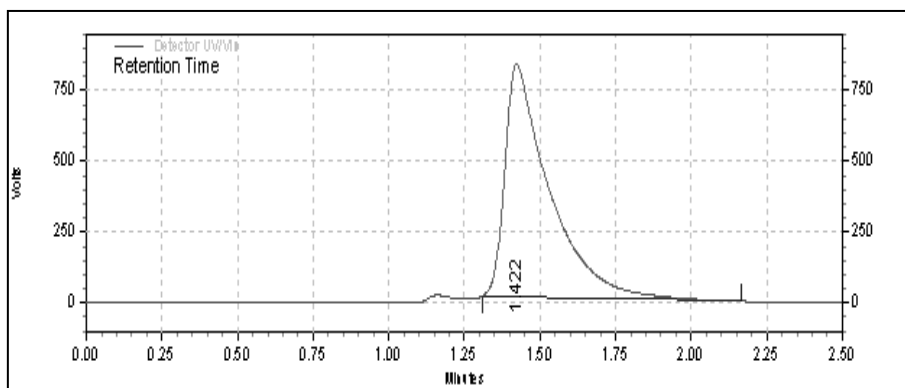


Figura 20. Cromatograma de una muestra de 500 $\mu\text{g/mL}$ de RIF analizada a 25 $^{\circ}\text{C}$, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil de ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.0 (61:39). ****

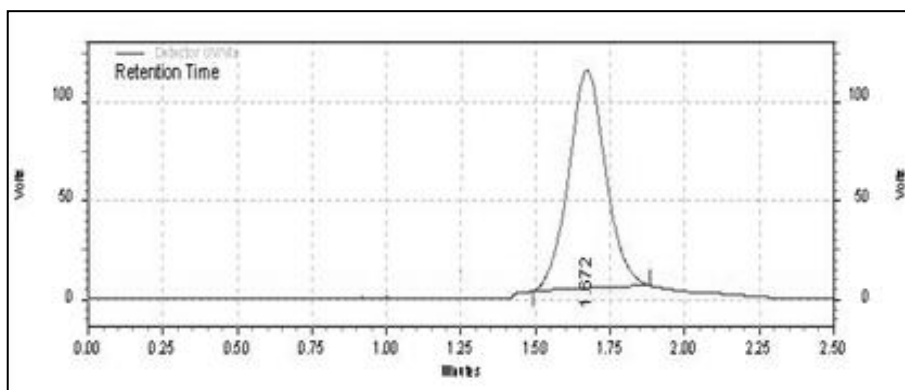


Figura 21. Cromatograma de una muestra de 500 $\mu\text{g/mL}$ de RIF analizada a 18 $^{\circ}\text{C}$, a 1 mL/min y a una proporción de fase móvil de ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (61:39). *****

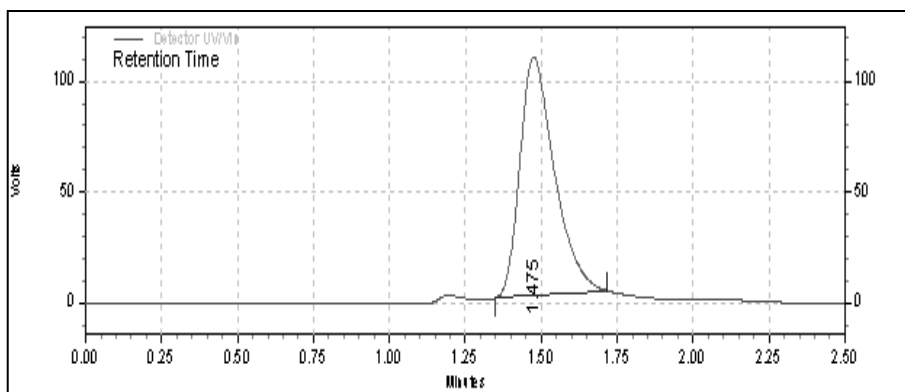


Figura 22. Cromatograma de una muestra de 500 $\mu\text{g/mL}$ de RIF analizada a 25 $^{\circ}\text{C}$, a 1.5 mL/min y a una proporción de fase móvil de ACN: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.27 (61:39). *****

Anexo 7. Datos de los cromatogramas registrados en la determinación de la estabilidad analítica de la muestra.

A. Muestras de 500 µg/mL de rifampicina almacenadas a temperatura ambiente, expuestas a la luz y preparadas sin BHT.

Tiempo	n	Área (mAbs)	Altura (Volts)	t _R (min)	Concentración recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
Concentración inicial (0 hrs.)	1	4980675	1029876	1.445	509.6736	101.9347
	2	4975638	1025674	1.444	509.1586	101.8317
	3	4959675	1012765	1.443	507.5266	101.5053
	Media					100.7572
6 hrs.	1	4598675	998543	1.440	470.6187	94.1237
	2	4589638	987953	1.447	469.6947	94.0215
	3	4593675	983265	1.441	470.1075	93.9389
	Media					94.0280
24 hrs.	1	3661720	868971	1.435	374.8263	74.9779
	2	3662341	859797	1.439	374.8898	74.9653
	3	3658987	849854	1.432	374.5469	74.9094
	Media					74.9509

B. Muestras de 500 µg/mL de rifampicina almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Tiempo	n	Área (mAbs)	Altura (Volts)	t _R (min)	Concentración recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
Concentración inicial (0 hrs.)	1	4898665	1047865	1.445	501.2890	100.2578
	2	4889938	1035876	1.455	500.3968	100.0793
	3	4893575	1045234	1.453	500.7687	100.1537
	Media					100.1636
6 hrs.	1	4871665	983786	1.400	498.5286	99.7057
	2	4865938	985587	1.420	497.9431	99.5886
	3	4867375	987523	1.444	498.0900	99.6180
	Media					99.6374
24 hrs.	1	4798665	981736	1.440	491.0652	98.2134
	2	4789938	979567	1.450	490.1730	98.0346
	3	4796375	982521	1.453	490.8311	98.1662
	Media					98.1380

C. Muestras de 500 µg/mL de rifampicina almacenadas a 4 °C y protegidas de la luz.

Tiempo	n	Área (mAbs)	Altura (Volts)	t _R (min)	Concentración recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
Concentración inicial (0 hrs.)	1	4976548	1029876	1.475	509.2517	101.8503
	2	4953975	1025674	1.475	506.9439	101.3887
	3	4871546	1012765	1.473	498.5165	99.7033
	Media					100.9808
6 hrs.	1	4976428	1026776	1.470	509.2394	101.8478
	2	4943875	1024974	1.476	507.9560	101.1822
	3	4868546	1012351	1.460	498.6187	99.6419
	Media					100.8906
24 hrs.	1	4960765	1026626	1.463	507.6380	101.5276
	2	4936983	1024831	1.468	505.2066	101.0413
	3	4856349	1012032	1.461	496.9627	99.3925
	Media					100.6538
48 hrs.	1	4920675	1019636	1.424	503.5393	100.7078
	2	4915638	1018431	1.420	503.0243	100.6048
	3	4839675	1011032	1.422	495.2580	99.0516
	Media					100.1214
72 hrs.	1	4832391	1013684	1.478	494.5134	98.9027
	2	4830543	1012396	1.480	494.3244	98.8645
	3	4828721	1010768	1.460	494.1382	98.8277
	Media					98.8650

Anexo 8. Cromatograma de una muestra de rifampicina sin BHT, almacenada durante 24 horas a temperatura ambiente y expuesta a la luz.

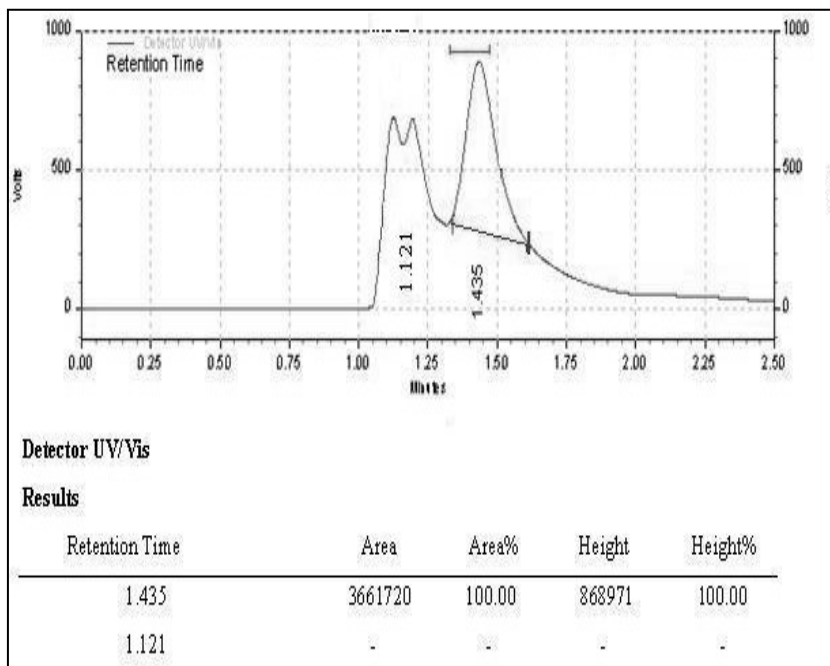


Figura 23. Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF preparada sin BHT, almacenada a temperatura ambiente y expuesta a la luz.*

* Cromatograma de una muestra de 500 µg/mL de RIF preparada sin BHT, almacenada a temperatura ambiente y expuesta a la luz. José Manuel Martín Gress / EZstar® 7.7 / Paint® 2007. 17 Nov 2013. Imagen escaneada. Archivo del autor.

XIII.- GLOSARIO.

- **Banda cromatográfica:** es la distribución (idealmente gaussiana) de la concentración de las especies eluidas alrededor de un valor central.
- **Cromatograma:** es el resultado gráfico de la cromatografía.
- **Cromatógrafo:** es el equipo que permite una separación sofisticada, por ejemplo, un cromatógrafo de gases o un cromatógrafo de líquidos.
- **Eficiencia de columna (N):** es la medida del grado de ensanchamiento de una banda cromatográfica; se suele expresar en términos de altura “H” de los platos o del número “N” de platos teóricos.
- **Factor de capacidad/ retención (k):** es el parámetro experimental que se utiliza para describir la velocidad de migración de los analitos en una columna determinada.
- **Línea base:** es la porción del cromatograma que registra la respuesta del detector cuando solo sale de la columna la fase móvil.
- **Número de platos teóricos:** es la característica de una columna cromatográfica que se emplea para describir su eficiencia.
- **Resolución (R):** Es el parámetro que proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos analitos e indicar la calidad de la separación.
- **Ruido:** se refiere a las fluctuaciones aleatorias de una señal analítica que proceden de un gran número de variables no controladas y que distorsionan la señal.
- **Señal:** se refiere a la representación gráfica del analito cuando pasa por el detector.
- **Tiempo muerto (t_M):** es el tiempo que tarda la fase móvil en pasar a través de la columna y es equivalente al tiempo para una sustancia no retenida.
- **Tiempo de retención (t_R):** es el tiempo transcurrido desde que el compuesto es inyectado hasta que alcance y genere una señal en el detector.