



**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 UN FÁRMACO ANTITUBERCULOSO:
CLOFAZIMINA”**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA**

PRESENTA

URIAS BAUTISTA SÁNCHEZ

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

JUNIO 2018



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 UN FÁRMACO ANTITUBERCULOSO:
CLOFAZIMINA”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA**

PRESENTA

URIAS BAUTISTA SÁNCHEZ

DIRECTOR:

DRA. ANA LUISA ROBLES PIEDRAS

CODIRECTOR:

M. EN C. ALEJANDRO CHEHUE ROMERO

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

JUNIO 2018



AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH
 P R E S E N T E

Por medio del presente, le informo que el Jurado asignado al Pasante de la Licenciatura en Farmacia **Urias Bautista Sánchez** con número de cuenta 216156, quien presenta el trabajo de tesis denominado **"Validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación *in vitro* de un fármaco antituberculoso: clofazimina"**, después de revisar el documento preliminar, ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

Nombre	Firma
Presidente Dra. Minarda De la O Arciniega	
Secretario M. en C. Ana María Téllez López	
1er Vocal Dra. Ana Luisa Robles Piedras	
2o Vocal M. en C. Alejandro Chehue Romero	
3er Vocal M. en C. Elena Guadalupe Olvera Hernández	
1er Suplente Dra. Claudia Velázquez González	
2o Suplente Dra. Isis Beatriz Bermúdez Camps	

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
 PACHUCA DE SOTO, HGO. A 25 DE JUNIO DE 2018

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
 DIRECTOR DEL ICSa



M. EN C. ELENA G. OLVERA HERNÁNDEZ
 JEFA DEL ÁREA ACADÉMICA DE FARMACIA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por todas las oportunidades que me ha brindado, por que sin duda alguna sin él, todo sería diferente. A mi padre por su ejemplo y su rigurosidad para con migo, a mi madre por ser mi amiga, mi cómplice y mi apoyo en todo momento, porque sin sus consejos no sé qué sería de mí, a mis hermanos por su apoyo en todos mis proyectos, gracias familia.

Agradezco a la Mtra. Georgina Almaguer por que sin duda alguna ella fue el medio para estudiar esta carrera, y también fue la precursora para que me enamorara de la investigación. Gracia al Mtro. Alejandro Chehue por su apoyo y por compartir su conocimiento para con un servidor, muchas gracias. Agradezco profundamente a la Dra. Ana Luisa Robles por haber confiado en mí, por la confianza que me ha brindado y por que sin duda alguna los conocimientos que me ha brindado son excesivos, gracias por todo su apoyo Dra., porque sin duda alguna Dios pone a las personas adecuadas en cada uno de nuestro camino.

Gracias a todos los profesores y personas que han contribuido a que este proyecto finalizara, en especial a los profesores del Área Académica de Farmacia. Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Tuberculosis como problemática actual	7
2.2. Clofazimina.....	8
2.3. Farmacodinamia de la clofazimina	8
2.4. Farmacocinética de la clofazimina.....	9
2.5. Reacciones adversas de la clofazimina.....	10
2.6. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).....	11
2.7. Validación de un método analítico.....	12
2.7.1 Adecuabilidad del sistema	13
2.7.2 Linealidad	13
2.7.3 Repetibilidad.....	13
2.7.4 Reproducibilidad.....	13
2.7.5 Robustez.....	13
2.7.6 Exactitud	14
2.7.7 Límite de detección	14
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVO GENERAL.....	17
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
VII. METODOLOGÍA.....	19
7.1. Condiciones cromatográficas del método analítico	19
7.1.1. Características del equipo y reactivos	19
7.1.2. Preparación de la solución de referencia	19
7.1.3. Determinación de las condiciones cromatográficas.....	20
7.2. Estandarización de la obtención de plasma de rata Wistar.....	20

7.3. Metodología para determinar los parámetros de desempeño de validación del método analítico	22
7.3.1. Adecuabilidad del sistema	23
7.3.2. Linealidad del sistema	23
7.3.3. Linealidad del método.....	24
7.3.4. Exactitud y repetibilidad del método.....	24
7.3.5. Precisión del método	25
7.3.6. Límite de detección y cuantificación.....	25
7.3.7. Robustez.....	25
7.3.8. Estabilidad	26
VIII. RESULTADOS.....	27
8.1. Determinación de las condiciones cromatográficas del método analítico.....	27
8.2. Resultados del plasma obtenido.....	28
8.3. Validación de un método analítico por CLAR para la cuantificación de CFZ (ver Anexo 2).....	28
8.3.1. Adecuabilidad del sistema	28
8.3.2. Linealidad del sistema	29
8.3.3. Linealidad del método.....	31
8.3.4. Exactitud y repetibilidad del método.....	34
8.3.5. Precisión del método	35
8.3.6. Límite de detección y cuantificación.....	37
8.3.7. Robustez.....	39
8.3.8. Estabilidad analítica de la muestra.....	42
IX. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	44
X. CONCLUSIONES.....	47
XI. REFERENCIAS	48
XII. ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de la clofazimina.....	9
Figura 2. Fundamento de la CLAR.....	12
Figura 3. Esquematización de extracción de sangre.....	22
Figura 4. Cromatograma de la inyección de 25 µL de CFZ Sref, a una concentración de 100 µg/mL.....	27
Figura 5. Relación concentración de 1, 5,10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL de CFZ en plasma vs. respuesta analítica para el área.....	31
Figura 6. Relación concentración de CFZ teórica vs. concentración recuperada.....	34
Figura 7. Relación concentración de CFZ de 0.5, 1 y 2 µg/mL vs. respuesta analítica del límite de detección y límite de cuantificación.....	39
Figura 8. Cromatogramas que muestran los diferentes picos, en condiciones diferentes de la muestra.....	41
Figura 9. Cromatogramas que muestran los diferentes picos, reportando el pico alcanzado a las 12 h, en condiciones diferentes de la muestra.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Esquemas posológicos para el tratamiento de tuberculosis.....	5
Tabla 2. Adecuabilidad del sistema, concentración de 100 µg/mL.....	28
Tabla 3. Linealidad del sistema con 3 curvas de calibración.....	29
Tabla 4. ANOVA de la linealidad del sistema para el área.....	30
Tabla 5. ANOVA de la linealidad del método para la cantidad recuperada	32
Tabla 6. Resultados de la linealidad del método.....	33
Tabla 7. Resultados de la exactitud y repetibilidad del método a concentración de 100 µg/mL	35
Tabla 8. Registro de datos obtenidos por 2 analistas diferentes en 2 días distintos para determinar la precisión del método a una concentración de 100 µg/mL	36
Tabla 9. Resultados para determinar el Limite de detección y Limite de cuantificación del método, con concentraciones de 0.5, 1, y 2 µg/mL.....	38
Tabla 10. Resultados de la robustez del método Concentración 200 (µg/mL).....	40
Tabla 11. Resultados de la estabilidad de CFZ con respecto al tiempo (horas), concentración de 10 µg/mL.....	43

ABREVIATURAS

ACN	ACETONITRILO
CV	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
CV_{Y/X}	COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LA REGRESIÓN
Id_il	DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN RESPECTO DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE LA CONDICIÓN NORMAL.
EMB	ETAMBUTOL
FEUM	FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
HPLC	HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
INH	ISONIACIDA
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
LD	LIMITE DE DETECCIÓN
IUPAC	INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY
LC	LIMITE DE CUANTIFICACIÓN
OMS	ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD
PZA	PIRAZINAMIDA
RIF	RIFAMPICINA
S	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
r	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
r²	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN
S_{Ref-RIF}	SOLUCIÓN DE REFERENCIA DE CFZ
S_{Y/X}	DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA REGRESIÓN
TB	TUBERCULOSIS
Tr	TIEMPO DE RETENCIÓN
VIH	VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA



"Una colección de pensamientos debe ser una farmacia, donde se encuentra
remedio a todos los males."

Voltaire

RESUMEN

La Tuberculosis (TB) es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. En 2015, 10.4 millones de personas enfermaron de TB y 1.8 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0.4 millones de personas con VIH), y más del 95 % de las muertes por TB se producen en países de ingresos bajos y medianos. En la actualidad ha surgido el reto de buscar nuevas, mejores y más eficaces opciones de tratamiento, que permita que los pacientes alcancen concentraciones terapéuticamente efectivas, con el propósito de mejorar las condiciones de la farmacoterapia, debido al desarrollo de farmacorresistencia en el tratamiento de la TB con los tratamientos de primera línea de elección. La manera de verificar que las concentraciones terapéuticas se alcancen, es a través de la medición de éstas; para ello, se implementan métodos analíticos para la cuantificación de fármacos, los cuales deben cumplir con estándares de calidad que aseguren un correcto análisis y que los datos obtenidos sean confiables. Esta confiabilidad la proporciona la validación de las metodologías analíticas; es decir, que se demuestre que el método establecido es lo suficientemente fiable para producir un resultado, de tal forma que antes de ser empleados de forma rutinaria en un laboratorio se asegure que los valores obtenidos cumplen los requerimientos de confiabilidad y reproducibilidad. El presente trabajo consta de una propuesta para validar un método analítico que permita cuantificar *in vitro* CFZ en plasma de ratas Wistar, con la finalidad de que este método analítico pueda ser el soporte de proyectos de investigación tales como la evaluación farmacocinética preclínica de nuevas formas farmacéuticas orales a base de CFZ, bajo los lineamientos de la NOM-SSA1-177-2013. En conclusión el método analítico propuesto arroja resultados confiables, exactos, precisos y reproducibles en el rango de 1-100 µg/mL.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una infección bacteriana causada por un germen de tipo bacilo llamado *M. tuberculosis*. La bacteria suele atacar los pulmones, pero puede también dañar otras partes del cuerpo. La TB se contagia casi exclusivamente a través de la inhalación de partículas transmitidas por el aire (aerosoles) que contienen *M. tuberculosis* y se dispersan sobre todo a través de la tos, el canto y otras maniobras respiratorias realizadas con esfuerzo por individuos con TB pulmonar activa y con esputo cargado de un número significativo de microorganismos (en general, los suficientes para que una muestra sea positiva) (CCPE, 2016).

Las personas con lesiones pulmonares cavitarias son las responsables del mayor número de contagios, debido al alto número de bacterias contenidas dentro de la lesión. Las partículas aerosolizadas (partículas de $< 5 \mu$ de diámetro) que contienen bacilos tuberculosos pueden permanecer suspendidas en las corrientes de aire ambiental durante horas, lo que aumenta el riesgo de diseminación. No obstante, una vez que las partículas se depositan sobre una superficie, resulta difícil volver a suspender los microorganismos (p. ej., al barrer el piso o sacudir ropa de cama) para que vuelvan a convertirse en partículas respirables. Si bien estas acciones pueden volver a suspender las partículas de polvo que contienen a los bacilos tuberculosos, son demasiado grandes para alcanzar las superficies alveolares donde se inicia la infección. El contacto con fómites (p. ej., superficies contaminadas, alimentos y respiradores personales) no parecen facilitar la diseminación (OMSGTTBM, 2016).

La capacidad de contagio de los pacientes con TB pulmonar activa no tratada es muy variable. Ciertas cepas de *M. tuberculosis* son más contagiosas, y los pacientes con baciloscopia positiva son más contagiosos que aquellos con resultados positivos sólo en el cultivo. Los pacientes con enfermedad cavitaria

(que está estrechamente relacionada con la carga de micobacterias en el esputo) son más contagiosos que los que no la presentan.

Los factores ambientales también son importantes. La transmisión aumenta ante la exposición frecuente o prolongada a pacientes no tratados que dispersan gran cantidad de bacilos tuberculosos en espacios cerrados superpoblados y poco ventilados; en consecuencia, los individuos que viven hacinados o en instituciones presentan mayor riesgo. Los profesionales sanitarios que entran en contacto estrecho con casos activos también tienen un riesgo más alto de contagiarse. Por lo tanto, las estimaciones de contagio varían ampliamente; algunos estudios sugieren que sólo 1 de cada 3 pacientes con TB pulmonar no tratada infecta contactos estrechos; la OMS estima que cada paciente sin tratamiento puede infectar entre 10 y 15 personas al año. Sin embargo, la mayoría de las personas infectadas no desarrolla la enfermedad activa.

La capacidad de contagio disminuye rápidamente una vez que se comienza un tratamiento eficaz; los microorganismos son menos infecciosos, incluso si persisten en el esputo, y la tos disminuye. Los estudios de los contactos familiares indican que la transmisibilidad termina dentro de las 2 semanas siguientes a que el paciente comienza un tratamiento eficaz.

En la TB pulmonar activa, incluso moderada o grave, los pacientes pueden no presentar síntomas, salvo “no sentirse bien”, con anorexia, cansancio y pérdida de peso, que aparecen gradualmente a lo largo de varias semanas, o pueden aparecer síntomas más específicos. La tos es muy frecuente. Al principio, la tos puede ser poco productiva con esputo amarillo o verde, en general al levantarse a la mañana, pero puede tornarse más productiva a medida que la enfermedad avanza (OMSGTTBM, 2016).

La enfermedad de tuberculosis se puede tratar tomando varios medicamentos durante un periodo de 6 a 9 meses. Los fármacos de primera línea contra la

tuberculosis, que componen los principales esquemas posológicos de tratamiento, incluyen los siguientes:

- Isoniazida (INH)
- Rifampina (RIF)
- Etambutol (EMB)
- Pirazinamida (PZA)

Los esquemas posológicos para el tratamiento de la enfermedad de tuberculosis tienen una fase inicial de 2 meses (ver Tabla 1), seguida de la fase de continuación en la que se eligen varias opciones de tratamiento, con una duración de 4 o 7 meses (para un total de 6 a 9 meses de tratamiento) (Alcaide Fernández de Vega, 2001).

La finalización del tratamiento se determina por la cantidad de dosis tomadas durante un periodo determinado. Sin embargo los pacientes no siempre responden al tratamiento adecuadamente debido a la resistencia bacteriana que se puede generar con el uso de los medicamentos de primera línea de elección (OMSGTTBM, 2016).

La resistencia bacteriana es la pérdida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico al que originalmente era susceptible, adquiriendo así la capacidad de soportar los efectos de dicho fármaco, el cual está destinado a eliminar o controlar al microorganismo. Una bacteria se considera resistente a un determinado antibiótico cuando la concentración máxima de dicha sustancia, que se puede alcanzar en el lugar de la infección no es suficiente para afectarle. Es decir que la concentración del antibiótico en el punto de infección es inferior a la concentración mínima inhibitoria necesaria para eliminar el germen, y debido a efectos secundarios tóxicos no es posible o aconsejable elevar la dosis. Por ello se requiere de nuevas formulaciones que permitan disminuir la resistencia bacteriana o bien proporcionar una alternativa terapéutica en los casos de resistencia bacteriana (OMSGTTBM, 2016) (CENAPRECE, 2017).

Tabla 1. Esquemas posológicos para el tratamiento de tuberculosis.

Esquema posológico preferido

Fase inicial	Fase de continuación
INH, RIF, PZA y EMB*: 56 dosis diarias (8 semanas)	INH y RIF: 126 dosis diarias (18 semanas) ó INH y RIF: 36 dosis, dos veces a la semana (18 semanas)

Esquema posológico alternativo

Fase inicial	Fase de continuación
INH, RIF, PZA y EMB*: 14 dosis diarias (2 semanas), luego 12 dosis, dos veces a la semana (6 semanas)	INH y RIF: 36 dosis, dos veces a la semana (18 semanas)

Esquema posológico alternativo

Fase inicial	Fase de continuación
INH, RIF, PZA y EMB*: 24 dosis, tres veces a la semana (8 semanas)	INH y RIF: 54 dosis, tres veces a la semana (18 semanas)

(Field, Fisher, Jarand, & Cowie, 2016)

Desde hace algunos años se ha considerado la nanotecnología como fuente importante en el uso de farmacoterapias ya que ésta es una herramienta que permite mejorar las condiciones del fármaco en organismos vivos (Leopoldo, 2016).

Actualmente un grupo de investigación de la Universidad Autónoma de Nuevo León, está desarrollando diferentes formulaciones orales a base de nano partículas, en las cuales se encapsula fármacos que son efectivos contra la TB, en este caso específicamente clofazimina (CFZ); esto con la finalidad de proveer una forma de entrega de fármaco más óptima y con ello incrementar la biodisponibilidad del fármaco en sangre a través de una mejora en la solubilidad del mismo. A su vez, el Cuerpo Académico de Farmacia Clínica del Área Académica de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), apoya la investigación en el desarrollo del proyecto con actividades

encaminadas a la evaluación farmacocinética preclínica de estos nuevos sistemas.

Como todo proceso de investigación que involucra la cuantificación de un principio activo, existe la necesidad de contar con métodos analíticos precisos, confiables y reproducibles (métodos analíticos validados), que permitan cuantificar la sustancia de interés basándose en diferentes técnicas analíticas, como la cromatografía de líquidos de alta resolución (DOF, 2013).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Tuberculosis como problemática actual

La Tuberculosis (TB) es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. En 2015, 10.4 millones de personas enfermaron de TB y 1.8 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0.4 millones de personas con VIH). Más del 95 % de las muertes por TB se producen en países de ingresos bajos y medianos (OMS, 2016). Seis países acaparan el 60% de la mortalidad total; encabeza esta triste lista la India, seguida de Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica. Se estima que en 2015 enfermaron de TB un millón de niños y que 170 000 niños murieron debido a esta causa (sin incluir los niños con VIH). La TB es una de las causas principales de defunción en las personas VIH-positivas: en 2015, el 35% de las muertes asociadas al VIH se debieron a la TB. En 2015 desarrollaron TB multirresistente (TB-MDR) unas 480 000 personas a nivel mundial (CENAPRECE, 2017).

En el año 2012 se reportó en México una incidencia de 16.8 casos por cada 100 000 habitantes, que correspondió a 19 697 casos de TB notificados; de estos casos 15 858 (81 %) fueron formas pulmonares, 17.8 % extrapulmonares y 1.5 % meníngeas; 11 % de los casos fueron pediátricos (<19años). La incidencia tuvo grandes variaciones internas desde 4.0 en Tlaxcala a 58.5 casos por 100 mil habitantes en Baja California. Los estados con mayor incidencia correspondieron a las rutas migratorias identificadas “sur-norte” del país. En este sentido, se tiene que en Hidalgo, en el 2014, se reportaron 156 casos, y en 2015 un total de 74 casos de TB (OMS, 2016).

Como ya se mencionó, el tratamiento de primera línea de elección para tuberculosis se base en cuatro fármacos que incluyen: INH, RIF, PZA y EMB, sin embargo debido a la farmacorresistencia que se ha presentado en las últimas décadas se ha considerado a la CFZ como tratamiento alternativo de segunda elección en los casos de farmacorresistencia a los tratamientos de

primera línea de elección para tuberculosis. (Arraiz, Bermúdez V, & Urdaneta , 2005)

2.2. Clofazimina

La CFZ es un colorante de fenazina utilizado como agente antimicobacteriano y antiinflamatorio. Es débilmente bactericida contra *M. leprae* y su actividad antimicrobiana sólo puede demostrarse en las personas tras una exposición continua de unos 50 días. Cuando se toma por vía oral se absorbe bien y la dosificación intermitente es eficaz porque el fármaco se acumula en el tejido adiposo y en las células del sistema retículo endotelial. Se elimina con lentitud por las heces, con una vida media de unos 70 días. Por ahora, los casos de resistencia a la CFZ son raros, cabe mencionar que también es eficaz contra *M. tuberculosis* por ser de la misma familia que *M. leprae*. Actualmente se considera útil en el tratamiento de segunda elección contra la TB, asociándola a diversos fármacos de primera elección, lo que favorece una mejor respuesta farmacoterapéutica, en la Figura 1 se muestra la estructura química de la CFZ (Duran & Correa, 2018).

El Nombre IUPAC de la CFZ es N,5-Bis(4-clorofenil)-3-(isopropilimino)-3,5-dihidro-2-fenazinamina, su fórmula molecular es C₂₇H₂₂N₄Cl₂ y tiene una masa molecular de 473,396 g/mol, su punto de ebullición y fusión son 566,9 ° C a 760 mmHg y 210-212 °C respectivamente, siendo su estado físico principalmente sólido. (Duran & Correa, 2018)

2.3. Farmacodinamia de la clofazimina

El mecanismo de acción exacto de la CFZ se desconoce, se ha encontrado que tiene un efecto lentamente bactericida sobre *M. leprae*, aparentemente, puede unirse de manera preferencial al ADN micobacteriano e inhibe su producción y el crecimiento, la unión se produce principalmente en secuencias de bases que contienen guanina. Puede producir una inhibición progresiva dependiendo de la dosis, sin embargo, es posible que la administración concomitante de dapsona

antagonice estos efectos antiinflamatorios o inmunosupresores (Duran & Correa, 2018).

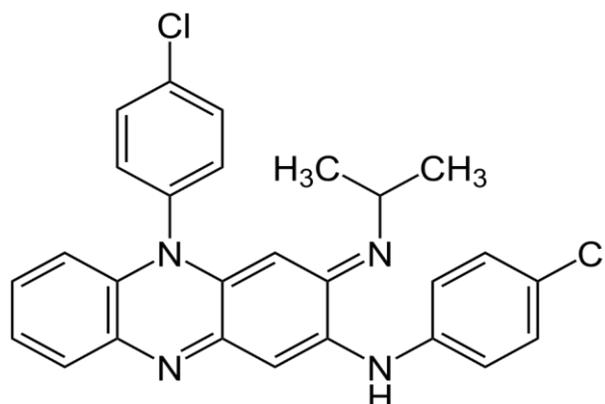


Figura 1. Estructura química de la clofazimina.

2.4. Farmacocinética de la clofazimina

Dentro de la clasificación biofarmacéutica, la clofazimina pertenece al grupo IV (poco soluble, poco permeable). La vía de administración de la CFZ más común es la oral, teniendo una absorción del 45-62 %; los alimentos aumentan la biodisponibilidad y la tasa de absorción por lo que para su administración se recomienda ser acompañada junto con alimentos o leche. Su metabolismo es primordialmente hepático, y cabe señalar que las concentraciones de CFZ desaparecen rápidamente en el flujo sanguíneo y comienzan a depositarse en los tejidos del cuerpo donde es lentamente liberada. (Monedero & Caminero, 2016).

La CFZ es altamente lipofílica, por lo que se distribuye principalmente a los tejidos grasos y al sistema retículo endotelial, además se concentra y puede cristalizar en los ganglios linfáticos mesentéricos, tejido adiposo, las glándulas suprarrenales, el hígado, los pulmones, la vesícula biliar, la bilis, el bazo, los músculos, el intestino delgado, los huesos y la piel (Duran & Correa, 2018).

La vía principal de excreción de CFZ es como fármaco inalterado a través de las heces, parte de esta excreción es material no absorbido y el resto es resultado de la excreción biliar. Pequeñas cantidades también pueden secretarse a través del sebo, esputo y sudor. Tiene un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 8-10 días en unidosis y en dosis múltiple de aproximadamente de 70 días (Field, Fisher, Jarand, & Cowie, 2016).

2.5. Reacciones adversas de la clofazimina

La CFZ atraviesa la placenta. No se han realizado estudios adecuados y bien controlados en humanos debido a que se desconoce un efecto teratógeno, aunque la piel de lactantes nacidos de madres que recibieron este tratamiento, estaba profundamente pigmentada al nacer. Además se excreta en la leche materna por lo que no se recomienda el uso en madres lactantes. Dentro de sus reacciones adversas más frecuentes se encuentra la coloración cutánea, además de dolor cólico abdominal, diarrea, náuseas, vómitos, piel seca, áspera o escamosa, en raras ocasiones puede desencadenar Infarto esplénico, obstrucción intestinal, hemorragia gastrointestinal, enteritis eosinofílica y muerte después de síntomas abdominales graves, pérdida de visión, ojos o piel amarilla, heces sanguinolentas negras alquitranadas (hemorragia gastrointestinal), depresión mental, (producto del color de la piel), mareos, somnolencia y cambios en el sentido del gusto. La dosis de la CFZ varía dependiendo la patología a tratar, siendo la dosis usual de 50 a 100 mg una vez al día. No se recomiendan dosis superiores a 300 mg al día (Duran & Correa, 2018).

2.6. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

La cromatografía engloba a un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla y su posterior detección. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido, o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta llegar al punto donde es introducida la muestra. Siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interactúan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando (W. Dong, 2016).

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) por sus siglas en inglés HPLC, pertenece al conjunto de técnicas utilizadas para separar los componentes de una mezcla, como cualquier otro método cromatográfico, es una herramienta sumamente útil para el análisis cuantitativo de mezclas de sustancias. El rápido crecimiento que este método analítico ha experimentado en las últimas décadas, si bien se debe a diversos factores, se basa fundamentalmente en la simplicidad con la cual se obtiene por CLAR resultados cuantitativos.

Actualmente la CLAR es capaz de cuantificar tanto impurezas en muy bajas concentraciones como macrocomponentes con niveles de precisión de tan bajos como 0.5 %, y aun menores. Como todo método de análisis cuantitativo está compuesto de diversos pasos, cada uno de los cuales debe estudiarse apropiadamente (ver Figura 2). Estos son (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 1992) (W. Dong, 2016):

- Muestreo
- Preparación de la muestra
- Inyección de la muestra

- Separación cromatográfica
- Detección
- Integración de la señal
- Calculo de la concentración de analito

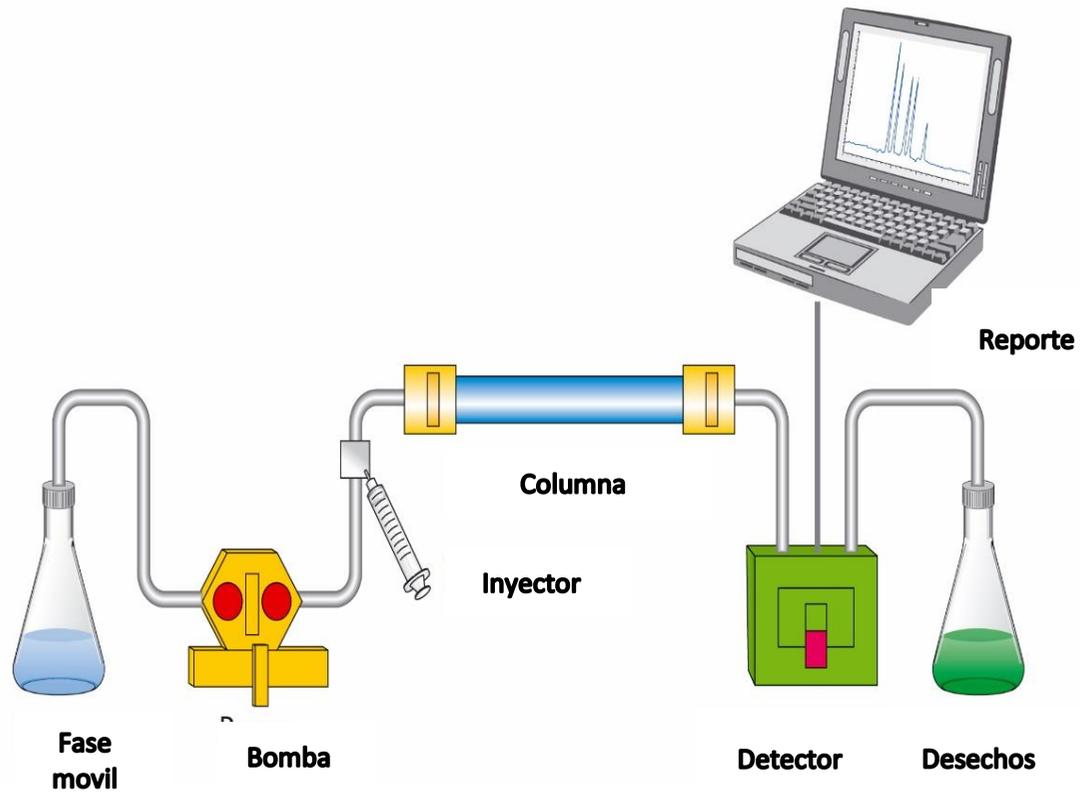


Figura 2. Fundamento de la CLAR (GITLJ, 2014).

2.7. Validación de un método analítico

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas, en otras palabras, es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado. Para ello se debe tomar en cuenta los siguientes parámetros: adecuabilidad, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, exactitud, límite de detección y cuantificación (FEUM, 2014) (DOF, 2013) (CNQFBM, 2002).

2.7.1 Adecuabilidad del sistema

Se define como la evaluación de la aptitud del procedimiento a realizar, tomando en cuenta las condiciones cromatográficas con las que se determinará el proceso de detección del analito.

2.7.2 Linealidad

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionado con la aplicación del método.

2.7.3 Repetibilidad

Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto.

2.7.4 Reproducibilidad

Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad.

2.7.5 Robustez

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante la ejecución del método sobre una misma muestra variando algunas condiciones operacionales como, por ejemplo, diferentes laboratorios, reactivos, analistas, equipos, temperaturas de ensayo, etcétera.

2.7.6 Exactitud

Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero.

2.7.7 Límite de detección

Se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado.

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad ha surgido el reto de buscar nuevas, mejores y más eficaces opciones de tratamiento, que permita que los pacientes alcancen concentraciones terapéuticamente efectivas, con el propósito de mejorar las condiciones de la farmacoterapia, debido al desarrollo de farmacorresistencia en el tratamiento de la TB con los tratamientos de primera línea de elección (OMS, 2016).

La manera de verificar que las concentraciones terapéuticas se alcancen, es a través de la medición de éstas; para ello, se implementan métodos para la cuantificación de fármacos, los cuales deben cumplir con estándares de calidad que aseguren un correcto análisis y que los datos obtenidos sean confiables. Esta confiabilidad la proporciona la validación de las metodologías analíticas; es decir, que se demuestre que el método establecido es lo suficientemente fiable para producir un resultado, de tal forma que antes de ser empleados de forma rutinaria en un laboratorio se asegure que los valores obtenidos cumplen los requerimientos de confiabilidad y reproducibilidad (CNQFBM, 2002).

El presente trabajo consta de una propuesta para validar un método analítico que permita cuantificar *in vitro* CFZ en plasma de ratas Wistar, con la finalidad de que este método analítico pueda ser el soporte de proyectos de investigación tales como la evaluación farmacocinética preclínica de nuevas formas farmacéuticas orales a base de CFZ (Queiroz, Pereira, Gotardo, Cordeiro, & Melchior, 2003).

IV. HIPÓTESIS

Si se valida un método analítico para cuantificar CFZ in vitro, entonces se asegurará que los resultados, son confiables y reproducibles, lo que nos da pauta a poder utilizar dicho método en futuros proyectos de investigación para la cuantificación de CFZ.

V. OBJETIVO GENERAL

Validar un método analítico por CLAR de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, para cuantificar CFZ en plasma de rata (DOF, 2013).

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las condiciones cromatográficas para la validación del método analítico.
2. Estandarizar la metodología para la obtención de plasma de rata Wistar a través de la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.
3. Determinar los parámetros de desempeño: adecuabilidad del sistema, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, exactitud, límite de detección y cuantificación, para la validación del método analítico, de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Condiciones cromatográficas del método analítico

7.1.1. Características del equipo y reactivos

Se empleó un cromatógrafo HITACHI® modelo L-6200 Intelligent Pump acoplado a un detector UV/Vis modelo L-7400 y a un horno para columna modelo L-7300. Se utilizó una precolumna 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 de la marca Phenomenex® de 150 mm L X 4.6 mm DI rellena de sílice inertsil 5u ODS-2 con un tamaño de partícula de 5 µm.

El software que se utilizó para la recolección y procesamiento de la información será EZstar® Chromatography Data System 7.7 y una interfaz de Scientific Software International® SS42X. Se utilizaron tubos de microcentrífuga Eppendorf® y micropipetas automáticas Eppendorf Reference® previamente calibradas, así como puntas para pipeta automática de la misma marca.

7.1.2. Preparación de la solución de referencia

Para la preparación de la solución de referencia utilizando CFZ de la marca Sigma® de lote SLBB7964V, se pesaron 2.5 mg de CFZ (considerando la pureza del reactivo), en una balanza analítica Precisa® 92SM-202 cuya precisión es de 0.1 mg previamente calibrada; y se disolvió en un matraz volumétrico de 25 mL, posteriormente se colocó en un baño ultrasónico Branson® 3800 durante aproximadamente 1 min, después se tomó 1 mL de esta solución y se llevó al aforo con plasma desnaturalizado de rata Wistar, a fin de obtener una muestra con una concentración final de 1000 µg/mL (Queiroz, Pereira, Gotardo, Cordeiro, & Melchior, 2003).

7.1.3. Determinación de las condiciones cromatográficas

Con una jeringa Hamilton® se inyectaron 25 µL de CFZ en el cromatógrafo con la finalidad de encontrar el tiempo de retención (T_r); se trabajó a una temperatura controlada de 24°C, y la proporción de fase móvil y la velocidad de flujo más adecuadas se obtuvieron al presentarse un cromatograma con un pico gaussiano sin señales de ruido y una línea base totalmente recta de acuerdo a esto se pudo determinar las condiciones cromatográficas óptimas para poder trabajar (ver Anexo 2). Se estableció una longitud de onda de trabajo de 286 nm de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos consultada para la detección de CFZ (FEUM, 2014).

La fase móvil utilizada fue Acetonitrilo (ACN): Ácido fosfórico (H_3PO_4) ajustado a pH 2.9 M en proporciones 75:25 % respectivamente. (FEUM, 2014)

7.2. Estandarización de la obtención de plasma de rata Wistar

Para la obtención de las muestras de plasma, se tomaron en consideración las medidas de seguridad e higiene, tanto en el laboratorio de biofarmacia como en el bioterio del ICASA, y se contó con la autorización y supervisión del Comité de Bioética del Bioterio de la UAEH (ver Anexo 1). Se trabajó con 20 ratas macho de la especie Wistar con un peso de 300 gramos \pm 10 gramos, las cuales estuvieron en condiciones establecidas en cuanto a alimentación, temperatura, luz ,etc. (DOF, 2001) (UNAM, 2003) (Livexlab, 2013).

La extracción de muestra se llevó a cabo mediante punción cardiaca, de acuerdo al siguiente procedimiento (DOF, 2001) (UNAM, 2003) (Livexlab, 2013):

- a) Se colocó una torunda de algodón impregnada con éter etílico en una cámara transparente de forma cilíndrica con tapa con capacidad de 2 litros, y se colocó a la rata dentro del dispositivo a fin de anestésiarla.
- b) Una vez anestesiada, se procedió a colocarla de cúbito supino de tal forma que se lograra palpar el ritmo cardiaco de ésta.

- c) Se procedió a utilizar una jeringa de 10 mL/aguja 23 G y esta se impregnó con heparina a una concentración aproximada de 10 UI por cada 10 mL de sangre a obtener, con la finalidad fin de que esta última disminuyera la hemólisis de la muestra a obtener (IB, 2016).
- d) Posteriormente se localizó la apófisis xifoides del esternón y se pinchó lateralmente a ésta, en dirección craneoventral con un ángulo de 30° ejerciendo una pequeña presión negativa en la jeringa una vez introducida hasta que salga sangre (ver Figura 3).
- e) Se procedió a llenar la jeringa hasta los 10 mL, retrayendo el émbolo lentamente.
- f) Se utilizó la cámara de eutanasia para sacrificar al animal cuando se completó la extracción.
- g) 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 hemólisis.
- h) Los tubos de ensaye se colocaron en una centrifuga Hettich® Rotofix a 3500 r.p.m. por 10 minutos.
- i) A continuación, se separó el sobrenadante obtenido y se depositó en otro tubo de ensaye para poder desnaturalizarlo.
- j) Para la desnaturalización del plasma se agregó ACN en proporción 1:1 con relación al plasma obtenido.
- k) Enseguida se agitó la mezcla en un vortex Daigger® Vortex-Genie 2, durante aproximadamente 5 minutos y se procedió a centrifugar la mezcla a 4000 r.p.m. por 15 minutos más.
- l) Una vez finalizado lo anterior, se separó el sobrenadante 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.
- m) Finalmente se colocó el total del plasma desnaturalizado y filtrado en frascos de vidrio con tapa hermética, y se almacenó a – 70°C para ser utilizado posteriormente.



Figura 3. Esquematación de extracción de sangre. (IB, 2016)

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

2.7.8 Se utilizó un volumen de inyección de 25 μL , las muestras que se prepararon a partir de SRef-CFZ, se agitaron en un vortex Daigger® Vortex-Genie 2 a velocidad de 5 de agitación durante un minuto antes de ser inyectadas en el cromatógrafo. De acuerdo a la “*Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013*”, se determinaron los siguientes parámetros de desempeño:

- Adecuabilidad del sistema
- Linealidad
- Repetibilidad

- Reproducibilidad
- Robustez
- Exactitud
- Límite de detección
- Límite de cuantificación

7.3.1. Adecuabilidad del sistema

A partir del SRef-CFZ preparado desde un inicio se tomaron alícuotas de 100 μL por sextuplicado y se llevaron al aforo con plasma desnaturalizado de rata Wistar a fin de obtener una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se analizó el área bajo la curva de cada una. Se calculó la media aritmética (\bar{x}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (%CV). Criterios de aceptación: el valor del CV deberá ser $\leq 2\%$.

7.3.2. Linealidad del sistema

A partir del SRef-CFZ preparado desde un inicio se depositaron alícuotas de 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 μL de cada solución por separado y se les adicionó 999.5, 999, 995, 990, 975, 950, 900 y 800 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar, para obtener muestras con una concentración final de 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$; después se realizó la inyección de las 27 muestras en el cromatógrafo y se midió el área bajo la curva de cada una. Se reportó la relación concentración vs. área bajo la curva de la respuesta obtenida por las muestras, 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 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 y valor del IC (β_1) no deberá incluir el cero.

7.3.3. Linealidad del método

A partir del SRef-CFZ preparado desde un inicio se depositaron alícuotas de 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 μL de cada solución por separado y se les adicionó 999.5, 999, 995, 990, 975, 950, 900 y 800 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener muestras con una concentración final de 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las 27 muestras en el cromatógrafo y se midió el área bajo la curva de cada una.

Se determinó la cantidad recuperada de CFZ y se reportó la relación concentración teórica vs. concentración recuperada se determinó la ecuación de la recta y se calculó el r , y el r^2 . 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% y la media aritmética del porcentaje de recobro deberá estar en el intervalo 98-102%. Finalmente, para comprobar la linealidad entre las curvas obtenidas se realizó un ANOVA.

7.3.4. Exactitud y repetibilidad del método

A partir del SRef-CFZ preparado desde un inicio se depositaron alícuotas de 100 μL de cada solución por separado y se les adicionó 900 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$; 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 CFZ y el porcentaje de recobro, con este último se \bar{x} , la S , el % CV y (IC (μ)). Criterios de aceptación: el valor del % CV deberá ser $\leq 2\%$, el IC (μ) deberá incluir el 100% y la \bar{x} del porcentaje de recobro deberá estar en el intervalo 98-102 %.

7.3.5. Precisión del método

A partir del SRef-CFZ preparado desde un inicio se depositaron alícuotas de 100 μL de cada solución por separado y se les adicionó 900 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió el área bajo la curva de cada una. Las muestras se analizaron en dos días diferentes por dos analistas diferentes con los mismos instrumentos y equipos. Se calculó la \bar{x} , la S y el % 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

A partir del SRef-CFZ preparado desde un inicio se depositaron alícuotas de 0.5, 1.0 y 2.0 μL de cada solución por separado y se les adicionó 999.5, 999 y 998 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener muestras con una concentración final de 0.5, 1.0 y 2.0 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una. Se reportó la concentración vs. área bajo la curva. Criterios de aceptación: el valor de r deberá ser ≥ 0.99 , el valor de r^2 deberá ser ≥ 0.98 , el IC (β_1) no deberá incluir el cero.

7.3.7. Robustez

A partir del SRef-CFZ preparado desde un inicio se depositaron alícuotas de 200 μL de cada solución por separado y se les adicionó 800 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, después se realizó la inyección de las muestras en el cromatógrafo y se midió la respuesta analítica de cada una a las condiciones cromatográficas determinadas para el método y en seis condiciones cromatográficas que incluirán ligeras

variaciones como la temperatura del horno de la columna, la velocidad de flujo, el pH de la fase móvil y la proporción de los disolventes de la fase móvil.

Se determinó la cantidad recuperada de CFZ y el porcentaje de recobro, de este último se calculó la \bar{x} a la condición normal del método, la \bar{x} de cada condición diferente a la condición normal y la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto de la media aritmética de la condición normal ($|d_i|$). Criterios de aceptación: el valor de ($|d_i|$) deberá ser $\leq 2\%$.

7.3.8. Estabilidad

A partir del SRef-CFZ preparado desde un inicio se depositaron alícuotas de 100 μL de cada solución por separado y se les adicionó 900 μL de plasma desnaturalizado de rata Wistar para obtener una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, posteriormente se sometieron a condiciones diferentes para determinar el pico de concentración de cada una de ellas.

Las condiciones a las que fueron sometidas fueron las siguientes:

- a) Temperatura ambiente ámbar.
- b) Temperatura ambiente expuesta a la luz.
- c) Temperatura ambiente expuesta a la luz y humedad.

Finalmente se calculó la media aritmética de los porcentajes de recobro de cada análisis inicial y de cada condición de almenaje, luego se calculó la diferencia absoluta entre ambas. Criterios de aceptación: el valor de ($|d_i|$) deberá ser $\leq 2\%$.

VIII. RESULTADOS

8.1. Determinación de las condiciones cromatográficas del método analítico

Las condiciones cromatográficas establecidas para el método se muestran a continuación, así como un cromatograma de la inyección de CFZ Sref. De 100 µg/mL (ver Figura 4) (Queiroz, Pereira, Gotardo, Cordeiro, & Melchior, 2003):

- Fase móvil: ACN: H₃PO₄ 0.1 M (ajustado a pH 2.9 con NaOH) proporción 75:25 v/v.
- Velocidad de Flujo: 1 mL/min.
- Temperatura del horno para columna: 24°C.
- Longitud de onda: 286 nm.
- Tiempo de retención (Tr): 3.155 minutos.
- Presión de la bomba: 2031 PSI.

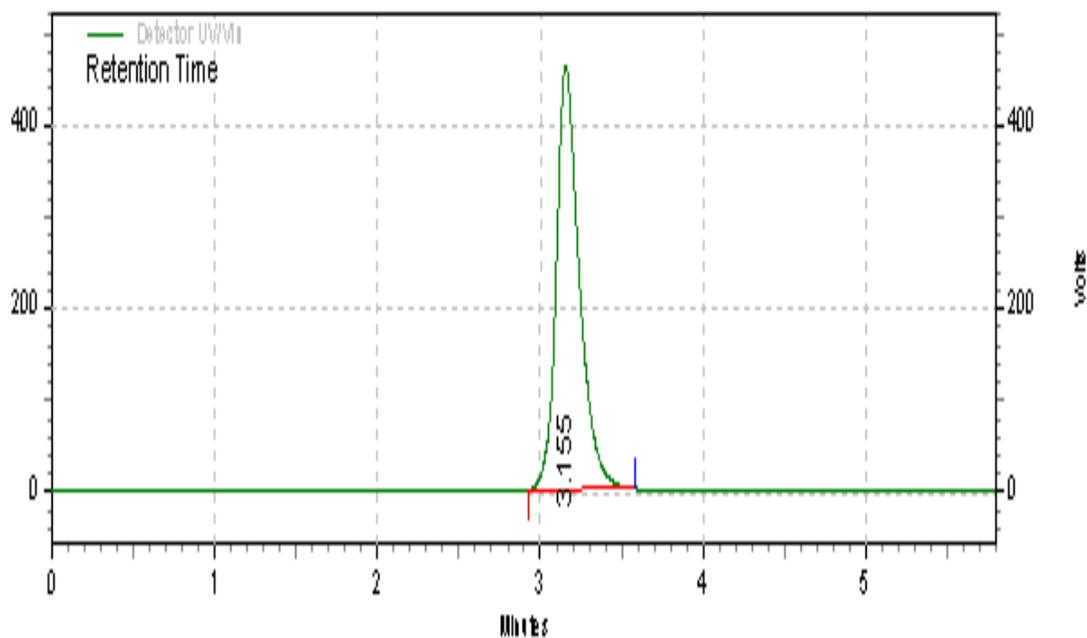


Figura 4. Cromatograma de la inyección de 25 µL de CFZ Sref, a una concentración de 100 µg/mL.

8.2. Resultados del plasma obtenido

Se obtuvo aproximadamente 180 mL de sangre total de 20 ratas, de la cual una vez tratada y desnaturalizada se obtuvo aproximadamente 150 mL de plasma.

8.3. Validación de un método analítico por CLAR para la cuantificación de CFZ (ver Anexo 2)

8.3.1. Adecuabilidad del sistema

En Tabla 2 se muestra los picos de los cromatogramas registrados de cada muestra de la concentración de CFZ de una concentración de 100 µg/mL. Se determinó la media aritmética, S y % CV para el área y la altura de los mismos picos.

Tabla 2. Adecuabilidad del sistema, concentración de 100 µg/mL.

n	AREA	ALTURA	Tr (minutos)
1	10202564	787045	3.08
2	10209831	776532	2.99
3	10202891	783251	3.02
4	10203526	788562	2.97
5	10208542	787045	2.99
6	10206542	784521	3.00
\bar{X}	10205649.33	784492.66	
S	3107.63	4347.48	
CV %	0.03	0.55	

Se obtuvo un % CV de 0.03 % para el área y un CV de 0.55 % para la altura. Por lo tanto y con base en los criterios establecido en la “Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013” y la “Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México” se demuestra la adecuabilidad del sistema (CNQFBM, 2002) (DOF, 2013).

8.3.2. Linealidad del sistema

La Tabla 3 Muestra los resultados con los picos de los cromatogramas obtenidos a partir de cada muestra, contiene el valor de r , r^2 e IC, calculados para el área y la altura de los mismos picos.

Tabla 3. Linealidad del sistema con 3 curvas de calibración.

CURVA	CONCENTRACION	AREA	ALTURA	Tr (minutos)
	$\mu\text{g/mL}$			
1	1	92225	14260	3.08
	5	504128	48144	2.99
	10	1010256	86521	3.02
	25	2555034	189007	2.97
	50	5062939	378014	2.99
	75	7494408	567021	3.00
	100	10202564	787045	3.07
2	1	92592	14270	3.10
	5	504395	49923	2.99
	10	1010523	83884	3.01
	25	2555301	182607	2.96
	50	5063206	365214	2.98
	75	7494675	547821	3.02
	100	10209831	776532	3.08
3	1	92552	14411	3.04
	5	504455	49012	3.01
	10	1010583	85652	3.03
	25	2555361	188260	2.97
	50	5063266	376521	2.97
	75	7494735	564781	3.12
	100	10202891	783251	3.01
	r	0.9999	0.9993	
	r^2	0.9998	0.9987	
	\bar{x}	3846472.38	292959.57	
	S	3678195.138	276263.551	
	IC 95 %	1387398	104205	

La Tabla 4 muestra el ANOVA de la linealidad del sistema para el área, la Figura 5 se muestra la relación concentración vs. respuesta analítica para el área y la altura, así como el valor de la ecuación de la recta respectiva.

De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos por la “Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013” y la “Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México”, r es > 0.99 , r^2 es > 0.98 e IC (β_1) no incluye al cero. Por lo tanto se demuestra que el sistema tiene linealidad.

Tabla 4. ANOVA de la linealidad del sistema para el área.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Curva 1	7	26921554	3845936.28	1.50E+13
Curva 2	7	26930523	3847217.57	1.50E+13
Curva 3	7	26923843	3846263.28	1.50E+13

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	6204994.40	2	3102497.20	2.06E-07	0.99	3.55
Dentro de los grupos	2.70E+14	18	1.50E+13			
Total	2.70E+14	20				

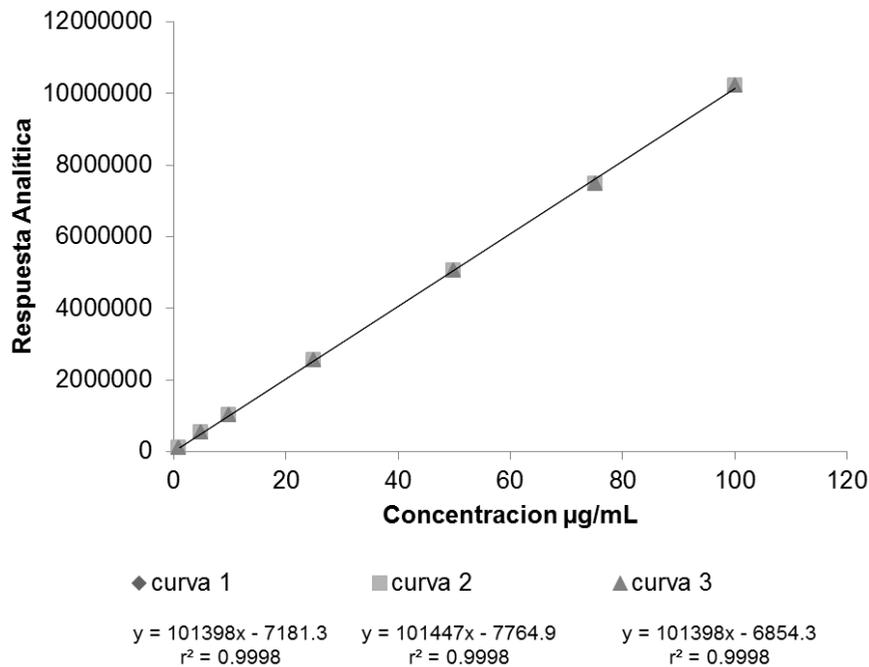


Figura 5. Relación concentración de 1, 5,10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL de CFZ en plasma vs. respuesta analítica para el área.

8.3.3. Linealidad del método

Para este parámetro de desempeño, primero se determinó la cantidad de CFZ recuperada y el porcentaje de recobro utilizando la ecuación de la recta obtenida en la relación concentración vs. área de los cuales se trabajó con la ecuación de la recta: $y=1.0002x-0.0008$, obteniendo así un $r^2= 0.9998$. En la Tabla 5 se muestra el ANOVA de la linealidad del método para la cantidad recuperada y en la Tabla 6, se muestra los resultados.

De acuerdo con los criterios establecidos por la “Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013” y la “Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México”, el valor de r debe ser > 0.99 , el de $r^2 > 0.98$. En este estudio, el % del CV para la cantidad

recuperada, resultó de 1.059 %, la media aritmética del porcentaje de recobro fue de 99.99 % (se encuentra dentro del intervalo 98-102%). Por lo tanto se demuestra que el método es lineal. En la Figura 6 se reporta la relación de la concentración teórica vs. la concentración recuperada.

Tabla 5. ANOVA de la linealidad del método para la cantidad recuperada.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Curva 1	7	265.99	37.99	1461.63
Curva 2	7	266.08	38.01	1462.89
Curva 3	7	266.02	38.001	1461.47

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	0.0006	2	0.0003	2.052E-07	0.99	3.55
Dentro de los grupos	26316.02	18	1462.001			
Total	26316.02	20				

Tabla 6. Resultados de la linealidad del método.

CURVA	CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)	AREA	CANTIDAD RECUPERADA ($\mu\text{g/mL}$)	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%)
1	1	92225	0.98	98.04
	5	504128	5.04	100.85
	10	1010256	10.03	100.34
	25	2555034	25.27	101.08
	50	5062939	50.00	100.00
	75	7494408	73.98	98.64
	100	10202564	100.69	100.69
2	1	92592	0.98	98.40
	5	504395	5.05	100.90
	10	1010523	10.04	100.37
	25	2555301	25.27	101.09
	50	5063206	50.00	100.01
	75	7494675	73.98	98.65
	100	10209831	100.76	100.76
3	1	92552	0.98	98.36
	5	504455	5.05	100.92
	10	1010583	10.04	100.37
	25	2555361	25.27	101.09
	50	5063266	50.01	100.01
	75	7494735	73.98	98.65
	100	10202891	100.69	100.69
		\bar{x}		99.99
		S		1.05
		CV%		1.05
		r	0.9999	
		r^2	0.9999	

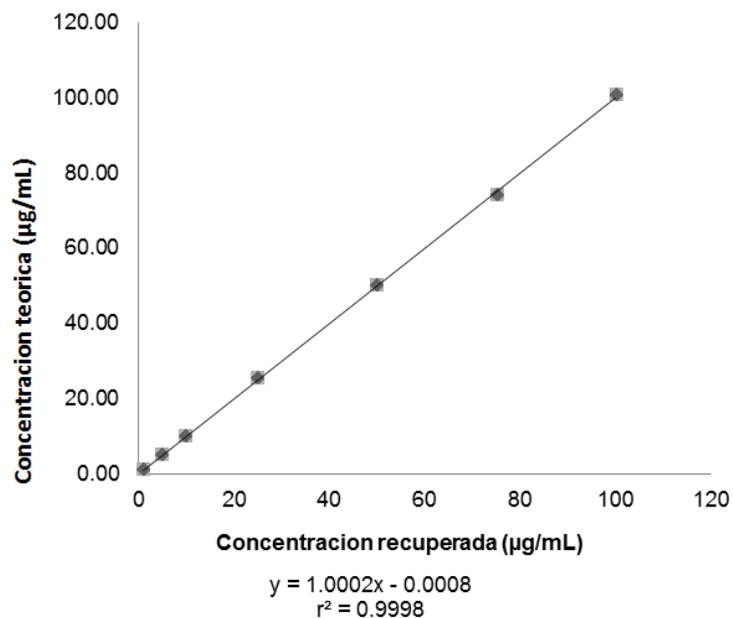


Figura 6. Relación concentración de CFZ teórica vs. concentración recuperada.

8.3.4. Exactitud y repetibilidad del método

Para el cálculo de estos parámetros, se determinó la cantidad de CFZ recuperada y el porcentaje de recobro utilizando la ecuación de la recta $y=101398x-6854.3$. En la Tabla 7 se muestra el análisis realizado. De acuerdo con los criterios de aceptación establecidos en la “*Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013*” se obtuvo un CV de 0.03% y un IC 95 % de 0.02 por lo que se demuestra que el método es exacto y repetible.

Tabla 7. Resultados de la exactitud y repetibilidad del método a concentración de 100 µg/mL.

n	AREA	CANTIDAD RECUPERADA (µg/mL)	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN
			(%)
1	10202564	100.69	100.69
2	10209831	100.76	100.76
3	10202891	100.69	100.69
4	10203526	100.70	100.70
5	10208542	100.75	100.75
6	10206542	100.73	100.73
		\bar{x}	100.71
		S	0.03
		IC 95 %	0.02
		IC (µ)+	100.74
		IC (µ)-	100.69
		CV %	0.03

8.3.5. Precisión del método

En la Tabla 8 se muestra la \bar{x} , la S y el CV calculados a partir de las áreas de los picos de los cromatogramas registrados, de las muestras analizadas por 2 analistas diferentes en 2 días distintos con los mismos instrumentos y equipos. De acuerdo al criterio de aceptación establecido por la “Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013” y la “Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México”, se obtuvo un CV >2% tanto para el área y la altura. Por lo tanto, se demuestra que el método es preciso.

Tabla 8. Registro de datos obtenidos por 2 analistas diferentes en 2 días distintos para determinar la precisión del método a una concentración de 100 µg/mL.

ANALISTA 1				
n	Área		Altura	Tr (min)
		DÍA 1		
1	10203799		118219	3.09
2	10211066		118202	3.00
3	10304126		118153	3.03
\bar{x}	10239664		118191.33	
S	55944.13		34.26	
% CV	0.54		0.02	
		DÍA 2		
1	10204761		118039	3.09
2	10209777		118275	3.11
3	10207777		118263	3.00
\bar{x}	10207438		118192.33	
S	2525.09		132.92	
% CV	0.02		0.11	
ANALISTA 2				
n	Área		Altura	Tr (min)
		DÍA 1		
1	10203322		118132	2.99
2	10230589		118115	3.01
3	10309649		118066	3.01
\bar{x}	10247853.30		118104.33	
S	55225.90		34.26	
% CV	0.53		0.02	
		DÍA 2		
1	10314284		117952	3.02
2	10219300		118188	2.97
3	10207300		118176	2.99
\bar{x}	10246961.30		118105.33	
S	58611.05		132.92	
% CV	0.57		0.11	

8.3.6. Límite de detección y cuantificación

Los límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC) se calcularon mediante el método de desviación estándar de la regresión. En la Tabla 9 se muestra el análisis realizado con el área de los picos registrados; se reportó la relación concentración vs. área y se determinó la ecuación de la recta (ver Figura 7). De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en la “*Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013*” y la “*Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México*”, el valor de r deberá ser > 0.99 y el valor de r^2 es > 0.98 , en los resultados obtenidos el valor de r fue 0.9999 , y el valor r^2 fue de 0.9998 . Por lo tanto, existe linealidad en los resultados.

Tabla 9. Resultados para determinar el Limite de detección y Limite de cuantificación del método, con concentraciones de 0.5, 1, y 2 µg/mL.

n	Concentración (µg/mL)	Area	Altura	S	CV %
1	0.5	7440	6076	33.60	0.45
2	0.5	7402	5970		
3	0.5	7469	6069		
4	1	14126	1176	41.78	0.29
5	1	14204	1170		
6	1	14139	1169		
7	2	28815	2352	43.73	0.15
8	2	28808	2341		
9	2	28887	2338		
				\bar{x}	
				0.5	7437.00
				1	14156.30
				2	28836.70
				S	10943.85
				Σ	50430.00
				r	0.9999
				r ²	0.9998
Ecuación				y = 14116x+282.41	
Pendiente				14325.57	
Ordenada al origen				96.83	
			Y2	XY	
			55308969	3718.5	
			200401773.40	14156.33	
			831553344.40	57673.33	
Σ			1087264087	75548.16	
				S para y/x	1834.57
LD = (3.3 * S_{y/x}) / m (µg/mL)				0.42	
LC = (10 * S_{y/x}) / m (µg/mL)				1.28	

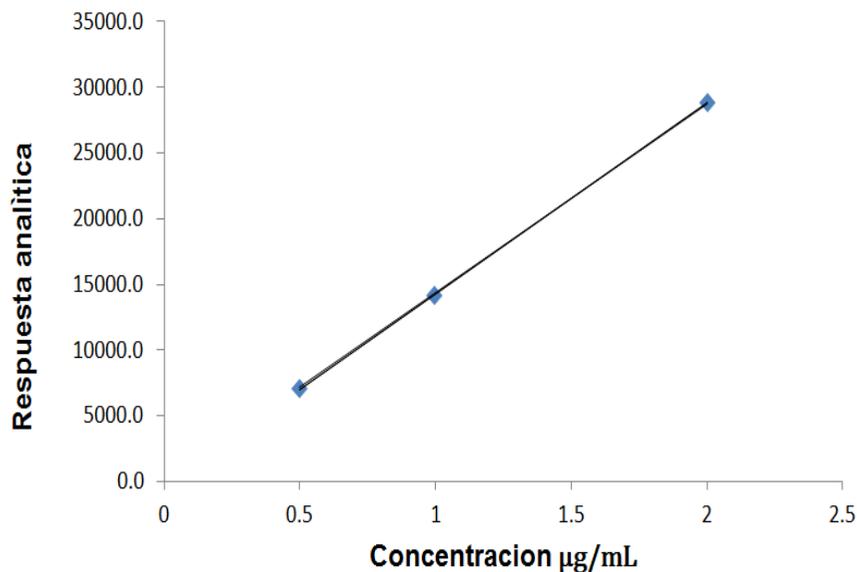


Figura 7. Relación concentración de CFZ de 0.5, 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ vs. respuesta analítica del Límite de detección y Límite de cuantificación.

8.3.7. Robustez

En la Tabla 10 se muestran los picos de los cromatogramas obtenidos a partir de tres muestras analizadas bajo las condiciones cromatográficas establecidas, para la determinación de este parámetro, se utilizaron sistemas a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ de CFZ; asimismo, se muestran de manera general los resultados para cálculo del porcentaje de recobro realizado en seis condiciones cromatográficas diferentes a la condición normal del método (Ver Anexo 3).

De acuerdo con los criterios de aceptación establecidos, el valor de $|d_n|$ es $< 2\%$ en cinco de seis condiciones cromatográficas, demostrándose que el método es robusto; sin embargo, a una temperatura mayor a 24°C el método pierde robustez, de igual manera ocurre a un pH mayor a 3 y menor a 2. En la Figura 8 se presentan los cromatogramas obtenidos para el cálculo de la robustez.

Tabla 10. Resultados de la robustez del método Concentración 200 (µg/mL).

Condición	Área	Concentración recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
Normal	2831642	199.69	99.85
Normal	2831124	199.66	99.83
Normal	2831521	199.68	99.84
Fase móvil 70:30 d1	2853000	201.20	100.60
Fase móvil 70:30 d1	2852614	201.17	100.59
Fase móvil 70:30 d1	2851542	201.10	100.55
Fase móvil 65:35 d2	2866878	202.18	101.09
Fase móvil 65:35 d2	2859622	201.67	100.83
Fase móvil 65:35 d2	2860254	201.71	100.85
pH 3.5 d3	2816082	198.59	99.30
pH 3.5 d3	2799687	197.44	98.72
pH 3.5 d3	2797652	197.29	98.65
pH 2 d4	2783524	196.30	98.15
pH 2 d4	2786524	196.51	98.26
pH 2 d4	2785421	196.43	98.22
T 26°C d5	2693524	189.95	94.98
T 26°C d5	2696524	190.16	95.08
T 26°C d5	2695421	190.09	95.04
T 16°C d6	2865214	202.06	101.03
T 16°C d6	2824512	199.19	99.59
T 16°C d6	2854215	201.28	100.64
\bar{x} normal	99.8384		
\bar{x} Fase móvil 70:30 d1	100.57	d1 (%)	0.73
\bar{x} Fase móvil 65:35 d2	100.92	d2 (%)	1.08
\bar{x} pH 3.5 d3	98.88	d3 (%)	0.95
\bar{x} pH 2 d4	98.20	d4 (%)	1.63
\bar{x} T 26°C d5	95.03	d5 (%)	4.80
\bar{x} T 16°C d6	100.42	d6 (%)	0.58

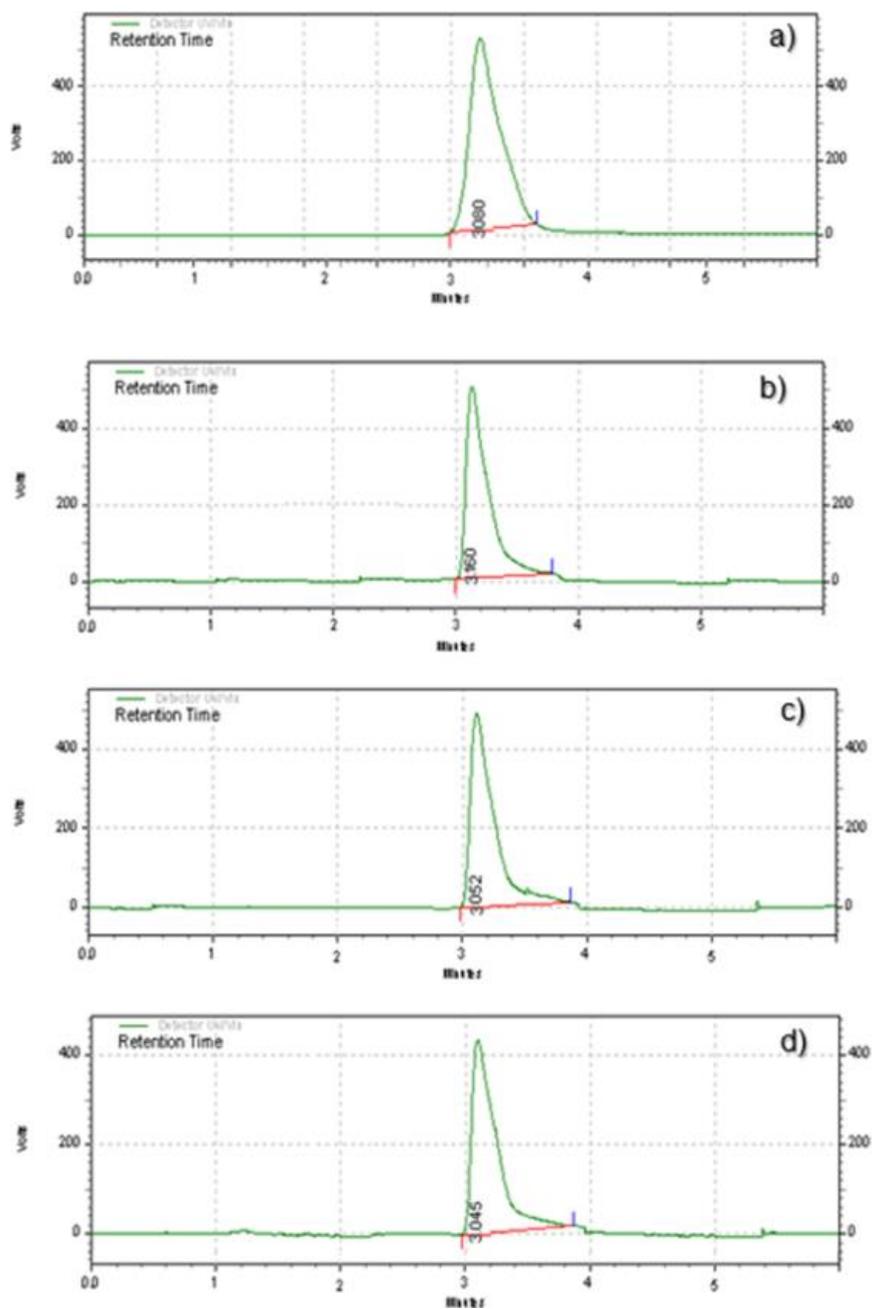


Figura 8. Cromatogramas que muestran los diferentes picos, en condiciones diferentes de la muestra: a) condición normal 75:25, b) Fase móvil 70:30, c) pH 2, d) T 26°C.

8.3.8. Estabilidad analítica de la muestra

En la Figura 9 se muestran los cromatogramas obtenidos en las diferentes condiciones de almacenaje de CFZ para determinar la estabilidad de esta. Para la determinación de este parámetro, se analizaron muestras a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, en 3 condiciones diferentes. En la Tabla 11 se muestra los resultados.

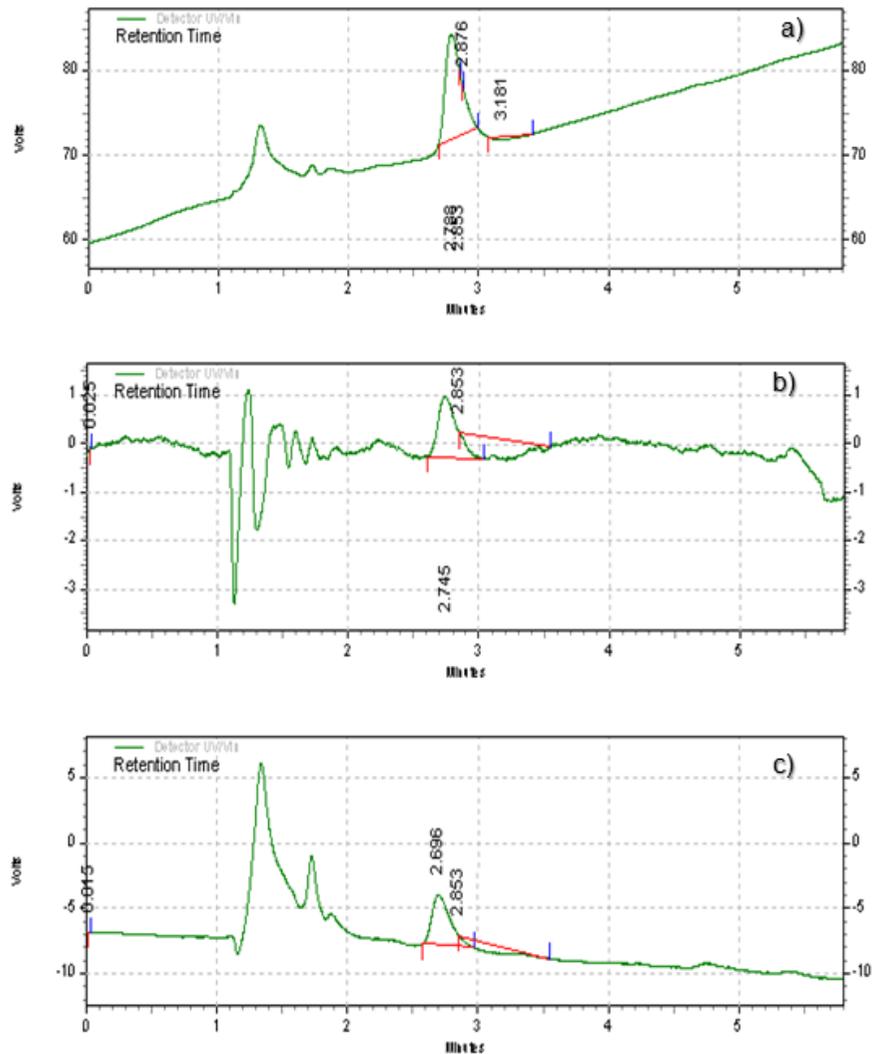


Figura 9. Cromatogramas que muestran los diferentes picos, reportando el pico alcanzado a las 12 h, en condiciones diferentes de la muestra: a) Temperatura ambiente ámbar, b) Temperatura ambiente expuesta a la luz, c) Temperatura ambiente expuesta a la luz y humedad.

Tabla 11. Resultados de la estabilidad de CFZ con respecto al tiempo (horas), concentración de 10 µg/mL.

h	n	Área	Promedio	Porcentaje de recobro (%)
0.1	1	1010523	1010454	
	2	1010256		
	3	1010583		
Temperatura ambiente ámbar				
2	1	659023	660507.66	65.21
	2	658666		65.17
	3	663834		65.68
6	1	279511	280253.66	27.65
	2	279333		27.64
	3	281917		27.89
12	1	105595	106031.66	10.44
	2	105490		10.43
	3	107010		10.58
Temperatura ambiente expuesta a luz				
2	1	71021	71086.33	7.02
	2	71095		7.03
	3	71143		7.03
6	1	30510	30542.66	3.01
	2	30547		3.02
	3	30571		3.02
12	1	12065	12084.33	1.19
	2	12087		1.19
	3	12101		1.19
Temperatura ambiente expuesta a luz y humedad				
2	1	7114	7259	0.70
	2	7250		0.72
	3	7413		0.73
6	1	3057	3129.33	0.30
	2	3125		0.31
	3	3206		0.32
12	1	1210	1252.66	0.12
	2	1250		0.12
	3	1298		0.13

IX. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se comprobó que el método cuenta con linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión y robustez, al cumplir con los parámetros de validación de métodos de acuerdo a la “*Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013*”. La precisión del método debe ser ejecutada con máxima minuciosidad debido a que la inyección es manual, las diferencias en cuanto a los tiempos de inyección de cada analista afectan significativamente en los resultados obtenidos.

Para la determinación de las condiciones cromatográficas se probaron diferentes tipos de columnas, de fases móviles, temperatura, pH y velocidad de flujo (Anexo 3), para así poder seleccionar las condiciones cromatográficas adecuadas para cuantificar el fármaco. En la Figura 4 se muestra el pico de un cromatograma obtenido a partir de la inyección de 25 μL de SRef-CFZ a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, en las condiciones más óptimas. El Tr obtenido, presentado por la CFZ bajo las condiciones cromatográficas establecidas, fue de 3.155 min y el valor promedio de las áreas de los picos, fue de 10205649. Tras la realización de diversos ensayos, se determinó utilizar una velocidad de flujo de 1 mL/min, ya que se observó, que si se incrementaba flujo, también se incrementaba considerablemente la presión de la bomba y la simetría de los picos obtenidos.

Tras la extracción del plasma, se obtuvo un volumen de 180 mL, y una vez tratado y desnaturalizado se obtuvo una recuperación de 150 mL lo que representó el 83.33 % del volumen total.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para la adecuabilidad del sistema, se tomó en cuenta el resultado del área de 6 picos; el valor del % CV calculado fue de 0.03 % para el área, y de acuerdo con el criterio de aceptación, demostró ser ≤ 2 %, por lo que se demuestra la adecuabilidad del sistema.

La linealidad del sistema se comprobó mediante los resultados de 3 curvas realizadas con 7 puntos diferentes, que se muestran en Tabla 3. Se analizó la respuesta analítica de cada muestra, tanto para el área como para la altura, y se decidió, que la cuantificación de CFZ con respecto al área del pico, resultaba en una mejor linealidad, comparado con a la altura; debido a esto, se decidió realizar los análisis en relación al área de los picos de las muestras, teniendo en cuenta nuestros criterios de aceptación en donde el valor de r obtenido fue de 0.9999, el valor de r^2 fue de 0.9998, se demuestra que el método es lineal, además de que el ANOVA (Tabla 6), demostró que el valor de F calculado es menor que el valor crítico para F , por lo que la varianza entre las medias poblacionales son muy similares.

En cuanto a la linealidad del método, los resultados se muestran en la Tabla 6. Se indica que el valor de r obtenido fue de 0.9999, el valor de r^2 de 0.9999, y que el porcentaje de recobro está dentro de un rango de 98-102%, con esto se demuestra la linealidad del método, además el ANOVA presentado en la Tabla 5 muestra que el valor de F calculado es menor al valor crítico para F , por lo que no existe variación significativa entre las medias poblacionales.

Los resultados del cálculo de la exactitud y repetibilidad del método se muestran en la Tabla 7, teniendo en cuenta los criterios de aceptación, en donde el valor del % CV fue de 0.03, el valor de IC (μ)+ fue 100.74 y para IC (μ)- de 100.69; se demuestra que el porcentaje de recobro entra en el rango de 98-102 %, por lo que el método es exacto y repetible.

Para la precisión del método, se muestran los resultados en la Tabla 8, en donde el resultado del % CV de los Analista 1 y 2 fueron de 0.53 y 0.57 respectivamente; con esto se demuestra que el método es preciso. En la Tabla 9 se muestran los resultados del límite de detección y cuantificación, teniendo en cuenta el valor de r deberá de 0.9999, y el valor de r^2 de 0.9998, se aceptan los datos obtenidos para el límite de detección y cuantificación, de 0.4 μg y 1.28 μg respectivamente. En este sentido, es necesario indicar, que concentraciones

menores a 1 µg/mL dan origen a picos cromatográficos que dificultan un poco, la integración de los mismos, no obstante, se pueden reproducir y analizar estadísticamente.

En la Tabla 10 se muestra la robustez del método a partir de la cuantificación de CFZ en condiciones diferentes. De acuerdo con los criterios de aceptación, el valor de (Idi I) deberá ser $\leq 2\%$, nuestros resultados muestran que por lo menos en 5 condiciones diferentes, se obtiene un valor de Idi I menor al 2 %, por lo que se demostró que el método es robusto. Para este análisis se debe ser muy metódico respecto a la forma y velocidad de inyección, pero sobre todo, en cuanto a la precisión al momento de la preparación de las muestras y la conservación de las mismas, ya que cualquier variación de éstas, modifica considerablemente la cuantificación de CFZ.

Los resultados de la estabilidad se muestran en la Tabla 11, en donde podemos observar los datos obtenidos al cambiar las condiciones cromatográficas, durante los ensayos; se pudo determinar que el pH es una variable importante a considerar, ya que se observó que a medida que el pH disminuía, el pico se coleaba y se comprometía la simetría del mismo, afectando el área de éste; por otro lado, si la temperatura aumentaba, los picos además de aparecer coleados, también se afectaba su altura. Se sabe, que tanto el pH como la temperatura, son 2 factores claves en la realización de ensayos cromatográficos. A partir de estas observaciones, se definió que durante la inyección de las muestras, estas debían mantenerse en recipientes con hielo y a pH de 2.9. Se observó que las muestras no son estables a temperatura ambiente, pues al cabo de 2 horas la concentración de CFZ desciende considerablemente; asimismo, se observó que las muestras son fotosensibles, ya que el área y simetría de los picos de los cromatogramas, evidencian una disminución en la concentración de CFZ en las muestras.

X. CONCLUSIONES

Se optimizó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar CFZ en plasma de rata, el cual es rápido y sencillo. El método se validó con base en la “*Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013*”. El método demostró ser lineal, preciso y exacto en el rango de 1-100 µg/mL y con una recuperación del fármaco en plasma de 99.99 % en promedio. Se demostró que las muestras de plasma con CFZ son estables a un pH de 2.9 y a una temperatura de 24 °C, en un lapso no mayor a dos horas. (Ver Anexo 4).

XI. REFERENCIAS

- Alcaide Fernández de Vega, F. (01 de 02 de 2001). *Guía de Práctica clínica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis*. Obtenido de <http://www.guiasalud.es/egpc/tuberculosis/completa/apartado00/preguntas.html>
- Arraiz, N., Bermúdez V, & Urdaneta, B. (2005). Resistencia a Drogas en M. TB: bases moleculares. *Farm Terap*, 1-15.
- CCPE. (20 de 06 de 2016). *Centros para el control y la prevención de Enfermedades*. Recuperado el 23 de 09 de 2017, de Tratamientos para la enfermedad de tuberculosis: <https://www.cdc.gov/tb/esp/topic/treatment/tbdisease.htm>
- CENAPRECE. (01 de 04 de 2017). *Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades*. Recuperado el 2018 de 01 de 12, de http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/portada_tuberculosis.html
- CNQFBM. (01 de 04 de 2002). *Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A. C.* Recuperado el 12 de 01 de 2017, de http://www.academia.edu/4513278/Guia_de_Validacion_de_metodos_analiticos_editada_por_QFB_de_Mexico
- DOF. (2001). *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. México: Secretaría de Salud.
- DOF. (2013). *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*. México: Secretaría de Salud.
- Duran, M. J., & Correa, K. P. (2018). Clofazimina. *Fundamentos de Química General y Orgánica*, 1-6.
- FEUM. (2014). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. México: Secretaría de Salud.
- Field, S. K., Fisher, D., Jarand, J., & Cowie, R. L. (2016). New treatment options for multidrug-resistant tuberculosis. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 255-268.
- GITLJ. (04 de 06 de 2014). *HPLC Analysis*. Recuperado el 06 de 15 de 2018, de Laboratorios Journal GIT: <https://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>
- IB. (22 de abril de 2016). *Cuidados con las ratas, ratones y conejos durante la experimentación animal*. Recuperado el 02 de 11 de 2017, de Instituto Butantan: <http://docplayer.es/8227250-Cuidados-con-las-ratas-ratones-y-conejos-durante-la-experimentacion-animal.html>
- Leopoldo, V. R. (01 de 04 de 2016). *Nanotecnología Farmacéutica*. Obtenido de <https://www.google.com/search?q=uso+de+la+nanotecnologia+para+nuevas+formulacion+de+medicamentos&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab>

- Livexlab. (13 de abril de 2013). *Toma y envío de muestras al laboratorio, manual de procedimientos*. Obtenido de <http://www.livex.com.ec/uploads/documentos/Manual%20de%20Toma%20de%20muestras.pdf>
- Monedero, I., & Caminero, J. (2016). Management of multidrug-resistant tuberculosis; an update. *therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 117-127.
- OMS. (01 de 06 de 2016). *Centro prensa tuberculosis*. Recuperado el 11 de 12 de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- OMSGTTBM. (01 de 04 de 2016). *Guía de la OMS para el tratamiento de TB multirresistente*. Recuperado el 04 de 02 de 2018, de TB multirresistente OMS: www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/.../GuiaDeLaOMSparaTratamientoDeTB.pdf
- Quattrocchi, O. A., Abelaira, s., & Laba, R. F. (1992). Introducción al HPLC. En *Introducción al HPLC* (págs. 302-328). argentina: artes graficas farro.
- Queiroz, R. H., Pereira, R. C., Gotardo, M. A., Cordeiro, D. S., & Melchior, E. J. (2003). Determination of Clofazimine in leprosy patients by high-performance liquid chromatography. *J Anal Toxicol*, 80-377.
- UNAM. (2003). La experimentacion bioética en animales en los codigos bioéticos. *Lab Acta*, 69-73.
- W. Dong, M. (2016). *Modern HPLC for practicing scientists*. New Jersey: Wiley.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Autorización del protocolo del comité de ética del bioterio



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

DGSA- BIOTERIO

CIECUAL

FORMATO DE SOLICITUD AL CIECUAL

Subdirección, Departamento o área de trabajo: Área Académica de Farmacia	
Responsable del Proyecto: M en C Alejandro Chehue Romero E mail: chehue_alex@yahoo.com Teléfono y/o fax: (771)7172000, ext. 5106	Fecha de solicitud: 22/11/2016
Título del Proyecto: Análisis Farmacocinética de la Clofazimina en ratas después de su administración oral en nanopartículas.	
Antecedentes nacionales o Internacionales del Experimento: <p>La clofazimina (CFZ) es un fármaco de segunda línea que se utiliza en el tratamiento de la tuberculosis resistente a los fármacos de primera línea o como alternativa en situaciones clínicas aisladas y se administra como formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata en combinación con otros fármacos, a dosis fijas [1,2].</p> <p>A nivel mundial, la aparición de cepas multirresistentes de M. tuberculosis es un problema creciente que afecta negativamente a la atención del paciente y a la salud pública, por lo que la CFZ está cobrando importancia para su uso en el tratamiento de esta enfermedad.</p> <p>La CFZ es un fármaco prácticamente insoluble en agua, altamente lipofílico, en humanos, presenta un tiempo de vida media de aproximadamente 70 días cuando ha sido administrada en dosis múltiples; en ratas, después de una dosis única, el $t_{1/2}$ es de aproximadamente 10 días. Presenta una biodisponibilidad variable (45-62%) [3].</p> <p>En los últimos años se han desarrollado estudios que permiten obtener sistemas de liberación controlada (nanopartículas, micropartículas), muchos de ellos de administración oral, que ofrecen ventajas respecto a las formulaciones convencionales [2]; para el caso de la CFZ, se ha encontrado que el uso de estas innovadoras formulaciones favorece el incremento de la absorción del fármaco, elevando así su biodisponibilidad [4].</p> <p>Una vez que se desarrolla la formulación, se procede a estudiar el comportamiento cinético del fármaco después de la administración de esa nueva formulación, mediante estudios preclínicos a través de los cuales se realiza la determinación de los parámetros farmacocinéticos (F, $t_{1/2}$, CL, Vd) para los que se requiere de un estricto y amplio muestreo que permita la construcción de perfiles concentración vs. tiempo.</p> <p>En este sentido, es de esperarse que se tenga la necesidad de contar con métodos analíticos confiables. A la fecha, se han publicado pocos estudios para llevar a cabo el análisis y cuantificación de CFZ en modelos animales [5].</p>	Objetivos: <p>Objetivo general Caracterizar la farmacocinética de la CFZ después de su administración en una nueva formulación en nanopartículas.</p> <p>Objetivos particulares</p> <ol style="list-style-type: none">1. Desarrollar y validar el método analítico para cuantificar CFZ en nanopartículas en plasma de ratón.2. Construir el perfil concentración de CFZ en plasma vs. Tiempo.3. Determinar los parámetros farmacocinéticos de la CFZ en nanopartículas en un modelo animal.

Para alcanzar el objetivo general de este estudio, se partirá del método cromatográfico propuesto por Krishnany Abraham [6], ajustando, modificando y validando el método analítico para cuantificar nanopartículas de CFZ en plasma de ratón, para posteriormente construir el perfil farmacocinético de concentración de CFZ en plasma vs. tiempo, y de este modo determinar los parámetros farmacocinéticos de la CFZ en nanopartículas en un modelo animal. Asimismo, dado la naturaleza lipofílica del fármaco y la disminución del tamaño de partícula y debido a que se trata del uso de una formulación totalmente innovadora, se cuantificará la cantidad depositada en órganos y tejido.

Referencias.

1. Reddy VM1, O'Sullivan JF, Gangadharam PR. Antimycobacterial activities of riminophenazines. J Antimicrob Chemother. 1999;43(5):615-23.
2. Pandey R1, Khuller GK. Nanotechnology based drug delivery system(s) for the management of tuberculosis. Indian J Exp Biol. 2006;44(5):357-66.
3. Cholo MC, Steel HC, Fourie PB, et al. Clofazimine: current status and future prospects. J Antimicrob Chemother. 2012;67(2):290-8.
4. Verma RK, Germishuizen WA, Motheo MP, et al. Inhaled microparticles containing clofazimine are efficacious in treatment of experimental tuberculosis in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(2):1050-2.
5. Borner K, Hartwig H, Leitzke S, et al. HPLC determination of clofazimine in tissues and serum of mice after intravenous administration of nanocrystalline or liposomal formulations. Int J Antimicrob Agents. 1999;11(1):75-9.
6. Krishnan TR, Abraham I. A rapid and sensitive high performance liquid chromatographic analysis of clofazimine in plasma. [Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1992;60(4):549-55.

Materiales y Métodos del ensayo:

Desarrollo de la metodología analítica. Se deberá obtener plasma de ratón libre de fármaco, para establecer las condiciones cromatográficas, desarrollar y validar el método analítico acorde a las condiciones de trabajo.

Para establecer todas las condiciones de validación del método, se utilizarán 50 ratones, los cuales primeramente serán anestesiados con éter, y mediante punción cardíaca se les extraerán TODA LA SANGRE 3 mL de sangre.

Posteriormente serán sacrificados en cámara de CO₂ y se recolectarán pulmones, hígado y tejido.

Para la caracterización Farmacocinética, se extraerán aproximadamente 3 mL de sangre por el método de punción cardíaca.

Administrando una dosis única de clofazimina estándar por vía oral a una dosis de 20 mg/Kg los tiempos de muestreo propuesto son: 0, 0.15, 0.5, 1, 2, 4, 7, 24, 48, 72 y 96 h. Para la construcción de los perfiles concentración vs. tiempo, se utilizarán 3 animales para cada tiempo de muestreo (11 tiempos de muestreo son 33 animales).

Administrando una dosis única de clofazimina nanoencapsulada a una dosis

Especie: CD1	Cantidad: 134
Línea:	Sexo: MACHO
Categoría:	Edad: 6-8 semanas
Peso: 18 a 20 g.	Fecha de Inicio: 06 /02/ 2017 Fecha de Continuación: 06/03/2016

de 20 mg/Kg los tiempos de muestreo propuestos son: 0, 1, 3, 6, 12, 24 h, 2, 5, 7, 10, 12 días, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 semanas.

17 tiempos de muestreo 3 ratones por tiempo 51 ratones.

Una vez extraídas las muestras de sangre, los animales serán sacrificados en cámara de CO₂ y se recolectarán pulmones, hígado y tejido.

Los tubos que contengan la sangre para la obtención del plasma, se centrifugarán a 3500 RPM durante 10 minutos y se almacenarán almacenar a -70°C hasta el día del análisis.

Método estadístico u otro empleado para el cálculo del número de animales que utilizara:
Se considera el número de 3 ratones a utilizar por cada tiempo de muestreo y en función del tiempo de T₀ a T_n h. Se realiza una prueba de Ji cuadrada para establecer las variables independientes y dependientes al azar y análisis de varianza considerando el promedio de la media aritmética, en un modelo de bloques al azar.

CLINICA	S I	N O	Frecuencia en que necesitara los datos	NUTRICION	
Signos Vitales		X		Dieta	normal
Peso	X		Cada 3 días	horario	2 PM
Consumo de Agua	X		Cada 3 días	cantidad	<u>Ad libitum</u>
Consumo Alimento	X		Cada 3 días	Observaciones:	
Jaula Metabólica		X			
Resumen Clínico conductual		X			
Condiciones ambientales			Frecuencia en que necesitara los datos		
Temperatura	X		Ambiente Diariamente		
Humedad Relativa		X			
Cambios de Aire		X			
Iluminación	X		Diariamente		

Observaciones:

PROCEDIMIENTOS QUE UTILIZARA

PROCEDIMIENTO	S I	N O	Frecuencia	Observaciones
Inmunización		X		
Administración de medicamentos	X		Una sola aplicación	A los ratones se les administrará una dosis única de fármaco (CFZ estándar y CFZ nanoencapsulada) por vía oral y se extraerán 3 mL de

				sangre a cada tiempo de muestreo. Posteriormente se sacrificarán sacrificados en cámara de CO ₂ .
Inoculación de agentes biológicos		X		
Sustancias peligrosas		X		
Cirugía		X		
Obtención de muestras	X			A partir de un ratón, se obtendrá una sola muestra de sangre a un solo tiempo de muestreo, posteriormente serán sacrificados en cámara de CO ₂ y se recolectarán pulmones, hígado y tejido.
Obtención de tejidos		X		
Selección del Punto Final	X			Criterios para su definición: Cuando se observen signos evidentes de dolor y/o sufrimiento durante la manipulación de los ratones, se procederá a aplicar la eutanasia a cualquiera de los animales utilizados en el experimento usando la cámara de CO ₂ .
Eutanasia	X			Método: Al final del experimento los animales serán sacrificados en cámara de CO ₂ .
FECHA	RESULTADO	S	N	OBSERVACIONES
	Aprobado	I	O	
	Negado			
	Propuesta de Cambios			
INVESTIGADOR		PRESIDENTE DEL CIECUAL		DIRECTOR BIOTERIO
M. en C. Alejandro Chehue Romero		Dr. Héctor Ponce Monter		Ing. Daniel Ramírez Rico

Anexo 2. Fórmulas ocupadas en el análisis estadístico.

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	$b = (\Sigma x^2_i \Sigma y_i - \Sigma x_i y_i) / (N \Sigma x^2 - (\Sigma x_i)^2)$
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

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

$$\begin{aligned} \text{IC}(\beta_1) &= m \pm t_{0.975, n-2} S_{m1} \\ S_{m1} &= S_{y/x} \left(\frac{1}{\sum x^2} - \frac{(\sum x)^2}{n^3} \right)^{1/2} \\ S_{y/x} &= \left(\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n-2} \right)^{1/2} \end{aligned}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA POBLACIONAL

$$\text{IC}(\mu) = (\sum y/n) \pm t_{0.975, n-1} (s/(n)^{1/2})$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN

$$\begin{aligned} \text{IC}(\beta_0) &= b \pm t_{0.975, n-2} S_{b0} \\ S_{b0} &= S_{y/x} \left(\frac{1}{n} + \frac{Z^2}{\sum x^2} - \frac{(\sum x)^2}{n^3} \right)^{1/2} \\ Z &= \sum x/n \end{aligned}$$

MEDIA ARITMÉTICA DE LA CONDICIÓN NORMAL

$$\bar{Y}_0 = \sum y_0 / n_0$$

MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN DIFERENTE A LA CONDICIÓN NORMAL

$$\bar{Y}_i = \sum y_i / n_i$$

DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN RESPECTO DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE LA CONDICIÓN NORMAL

$$|d_i| = |\bar{Y}_i - \bar{Y}_0|$$

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

$$LC = (10 * S_{y/x}) / m$$

LÍMITE DE DETECCIÓN

$$LD = (3.3 * S_{y/x}) / m$$

Anexo 3. Determinación de las condiciones cromatográficas optimas,
Concentración 200 (µg/mL).

Condición	Área	Concentración recuperada (µg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
Fase móvil 80:20	2465215	173.85	86.93
Fase móvil 80:20	2498562	176.20	88.10
Fase móvil 80:20	2485214	175.26	87.63
Fase móvil 75:25	2831642	199.69	99.85
Fase móvil 75:25	2831124	199.66	99.83
Fase móvil 75:25	2831521	199.68	99.84
Fase móvil 70:30	2853000	201.20	100.60
Fase móvil 70:30	2852614	201.17	100.59
Fase móvil 70:30	2851542	201.10	100.55
Fase móvil 65:35	2866878	202.18	101.09
Fase móvil 65:35	2859622	201.67	100.83
Fase móvil 65:35	2860254	201.71	100.85
pH 3.5	2816082	198.59	99.30
pH 3.5	2799687	197.44	98.72
pH 3.5	2797652	197.29	98.65
pH 2	2783524	196.30	98.15
pH 2	2786524	196.51	98.26
pH 2	2785421	196.43	98.22
T 26°C	2693524	189.95	94.98
T 26°C	2696524	190.16	95.08
T 26°C	2695421	190.09	95.04

T 16°C	2865214	202.06	101.03
T 16°C	2824512	199.19	99.59
T 16°C	2854215	201.28	100.64
T 26°C	2551624	179.94	89.97
T 26°C	2587451	182.47	91.24
T 26°C	2498562	176.20	88.10

ANEXO 4. Consideraciones para la cuantificación de CFZ.

- ♣ Después de la extracción de 10 mL de sangre, se recomienda desnucar al animal de acuerdo con las normas de bioética para que la muerte del animal sea más rápida.
- ♣ Una vez obtenida la muestra del animal se recomienda procesarla en los próximos 30 minutos después de la extracción a fin de optimizar los resultados.
- ♣ En cuanto al proceso de inyección de muestras se recomienda mantener las muestras con hielo si es necesario, a fin de que estas se encuentren en una temperatura de 14-24 °C.
- ♣ Se recomienda un flujo de la bomba menor a 1.5 debido al esfuerzo que puede sufrir la bomba por la inyección de plasma.