

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE NOVEDOSAS METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS AMBIENTALMENTE COMPATIBLES
PARA MONITOREO TERAPÉUTICO Y ESTUDIOS
FARMACOCINÉTICOS DE ANTIRRETROVIRALES
EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

Gabriel Alejandro Hunzicker

Director de Tesis: Dra. Jorgelina Cecilia Altamirano

Co-director de Tesis: Dra. Silvia Raquel Hernández

Lugar de realización: Química Analítica I - FBCB - UNL

-2017-

*Un científico sin criterio es un simple
almacenador de conocimiento*

Agradecimientos

A la familia Domínguez, por darme la posibilidad de realizar esta Tesis. Especialmente a Elsa y Mario, por estar convencidos de que en las empresas de base tecnológica también se pueden generar recursos humanos altamente calificados, por su confianza, apoyo, paciencia y energía para acompañarme en esta etapa de mi formación académica.

A mi directora Jorgelina Altamirano, por confiar en este desafío a la distancia, por tenerme paciencia, entenderme, por sus conocimientos y por transmitirme su entusiasmo por la Química Analítica.

A mi co-directora Silvia Hernández, por haber aceptado ayudarme sabiendo el desafío que afrontaba, por su transparente amistad y por todo lo que me brindó para que esta tesis llegara a su fin.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, a sus autoridades y al Comité Académico del Doctorado por recibirme como alumno de la carrera de doctorado en Ciencias Biológicas.

Al CONICET por haberme posibilitado el desarrollo de la Tesis a través de las becas de posgrado co-financiadas con empresas.

A mis compañeros de laboratorio de DominguezLab S.R.L., que han participado en la obtención de los resultados y me han acompañado en este camino.

A mi familia, por incentivar me siempre en el estudio.

Producción científica

A continuación se presenta la producción científica obtenida a lo largo del desarrollo de la presente tesis:

- **Hunzicker, G. A.**, Hein, G. J., Hernández, S. R., y Altamirano, J. C. (2015). Cloud point extraction for analysis of antiretrovirals in human plasma by UFLC-ESI-MS/MS. *Analytical Chemistry Research*, 6, 1–8.
- **Hunzicker, G. A.**, Hein, G. J., Baldo, M. N., Hernández, S. R. y Altamirano, J. C. (2016). Pharmacokinetic and bioequivalence study of Tenofovir Disoproxil Fumarate under fasting conditions on Argentine healthy-volunteers. Optimization and validation of SPE-LC-MS/MS for determination of Emtricitabine , Lamivudine and Tenofovir in human plas. *The Pharmaceutical and Chemical Journal*, 3(4), 157–168.

Las siguientes publicaciones no contienen resultados volcados en la presente tesis, sin embargo, las herramientas y conocimientos adquiridos estuvieron relacionados a los objetivos generales planteados en la misma; por lo que se considera una contribución sustancial.

- Baldo M. N., **Hunzicker, G.A.**, Altamirano, J. C., Murguía, M. C. y Hein, G. J. (2015). Bioequivalence Evaluation of Two Brands of Ketoprofen 50 Mg Capsules (Flogofin[®]&Profenid[®]) In Healthy Latin American Volunteers. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability* 7(3): 90-94.
- Baldo M. N., **Hunzicker, G.A.**, Altamirano, J. C., Murguía, M. C. y Hein, G. J. (2015). Saliva as a Noninvasive Biological Sample to Compare Bioavailability of Phenytoin Formulations by LC-MS/MS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6(9): 3752-60.

Índice

Agradecimientos	3
Producción científica	4
Índice	5
Índice de Tablas	10
Índice de Ilustraciones	14
Acrónimos y Abreviaturas	18
Resumen	21
Abstract	24
1. MARCO TEÓRICO	27
1.1 Introducción VIH-SIDA	28
1.1.1 Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	28
1.1.2 Epidemiología.....	29
1.1.3 Antirretrovirales utilizados en el tratamiento por infección de VIH	31
1.1.4 Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA)	33
1.2 Investigación clínica en humanos	34
1.2.1 Farmacocinética: conceptos y parámetros.....	36
1.2.2 Estudios de bioequivalencia	38
1.2.3 Diseño de estudio de BE.....	40
1.2.3.1 Voluntarios	42
1.2.3.2 Criterios estadísticos	43
1.2.3.3 Criterios de aceptación de BE.....	45
1.3 Metodologías bionalíticas en estudios farmacocinéticos.....	47
1.3.1 Cromatografía.....	47
1.3.1.1 Clasificación de los métodos cromatográficos	48
1.3.1.2 Sistema cromatográfico	50
1.3.1.3 Tipos de cromatografías líquidas	51
1.3.1.3.1 Cromatografía en fase reversa	53
1.3.1.4 Comportamiento cromatográfico de los solutos	55

1.3.1.4.1	Retención y factor de capacidad.....	55
1.3.1.4.2	Eficacia.....	56
1.3.1.4.3	Separación y resolución.....	57
1.3.1.4.4	Dispersión de bandas.....	58
1.3.1.5	Sistemas de detección para cromatografía líquida.....	59
1.3.2	Espectrometría de masa.....	61
1.3.2.1	Espectrómetro de masas.....	63
1.3.2.2	Métodos de ionización.....	64
1.3.2.3	Fuentes de ionización.....	66
1.3.2.3.1	Ionización por electronebulización.....	68
1.3.2.4	Analizadores de masas.....	72
1.3.2.5	Introducción al cuadrupolo lineal.....	76
1.3.2.5.1	Espectrómetros con varios cuadrupolos en tandem.....	79
1.3.2.6	Efecto matriz.....	81
1.3.3	Preparación de muestras biológicas.....	83
1.3.3.1	Precipitación de proteínas.....	85
1.3.3.2	Extracción en fase sólida.....	86
1.3.3.3	Extracción de punto nube.....	87
1.3.4	Validación de metodologías bioanalíticas.....	89
1.3.4.1	Selectividad.....	91
1.3.4.2	Veracidad.....	91
1.3.4.3	Precisión.....	91
1.3.4.4	Límite de cuantificación.....	92
1.3.4.5	Rango Lineal.....	92
1.3.4.6	Recuperación.....	92
1.3.4.7	Efecto de matriz normalizado (EMN).....	93
1.3.4.8	Estabilidad del analito en matriz.....	93
1.4	Hipótesis del trabajo de tesis.....	95
1.5	Objetivos generales del trabajo de tesis.....	96
1.5.1	Objetivos específicos.....	97
2.	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA BIOANALÍTICA POR HPLC-UV PARA CUANTIFICAR EFAVIRENZ EN PLASMA HUMANO: ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA.....	98
2.1	Resumen.....	99
2.2	Introducción.....	100

2.2.1	Aspectos farmacológicos y farmacocinéticos.....	100
2.3	Objetivo	101
2.4	Experimental.....	102
2.4.1	Metodología de trabajo.....	103
2.4.2	Formulaciones en estudio.....	104
2.4.3	Diseño del estudio	105
2.4.4	Extracción, manejo y almacenamiento de las muestras biológicas	105
2.5	Resultados y Discusión.....	106
2.5.1	Desarrollo de la metodología bioanalítica	106
2.5.2	Resultados de la validación del método analítico.....	107
2.5.2.1	Especificidad.....	108
2.5.2.2	Rango lineal	109
2.5.2.3	Precisión y veracidad Intra e Inter día	111
2.5.2.4	Recuperación	112
2.5.2.5	Estabilidad en matriz	113
2.5.2.6	Cifras analíticas de mérito	113
2.5.3	Comparación de metodologías analíticas	114
2.5.4	Resultados del estudio clínico	115
2.6	Conclusiones.....	119
3.	EXTRACCIÓN DE PUNTO DE NUBE PARA DETERMINAR ABACAVIR, EFAVIRENZ, LAMIVUDINA y NELFINAVIR EN PLASMA HUMANO MEDIANTE LC-MS/MS.....	121
3.1	Resumen	122
3.2	Introducción.....	123
3.3	Objetivos.....	125
3.4	Experimental.....	125
3.4.1	Metodología de trabajo.....	126
3.5	Resultados y Discusión.....	127
3.5.1	Desarrollo de la metodología bioanalítica	127
3.5.2	Metodología de preparación de muestras por CPE.....	130
3.5.2.1	Concentración de surfactante Tritón X-114.....	131
3.5.2.2	Efecto del pH en CPE	134
3.5.2.3	Optimización de la temperatura y tiempo de extracción.....	137

3.5.2.4	Efecto de modificadores en CPE	137
3.5.3	Resultados de la validación del método analítico.....	138
3.5.4	Comparación de metodologías bioanalíticas	141
3.6	Conclusiones.....	142
4.	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA BIOANALÍTICA DE SPE LC-MS/MS PARA CUANTIFICAR EFAVIRENZ, EMTRICITABINA Y TENOFOVIR EN PLASMA HUMANO: APLICACIÓN A UN ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD COMPARADA	144
4.1	Resumen	145
4.2	Introducción.....	146
4.2.1	Aspectos Farmacológicos de EFV, FTC y TDF.....	146
4.3	Objetivo	148
4.4	Experimental.....	148
4.4.1	Metodología de trabajo.....	150
4.4.2	Formulaciones en estudio	151
4.4.3	Aspectos farmacocinéticos	151
4.4.4	Diseño del estudio	152
4.4.5	Extracción, manejo y almacenamiento de las muestras biológicas	153
4.5	Resultados y Discusión.....	153
4.5.1	Desarrollo de la metodología bioanalítica	153
4.5.2	Metodología de preparación de recta de calibración, CC y muestras SPE.....	155
4.5.2.1	Extracción en fase sólida	156
4.5.3	Resultados de la validación del método analítico.....	159
4.5.3.1	Efecto arrastre.....	159
4.5.3.2	Especificidad.....	159
4.5.3.3	Rango lineal	160
4.5.3.4	Precisión y veracidad intra e inter día.....	161
4.5.3.5	Efecto matriz normalizado	162
4.5.3.6	Estabilidad en matriz	162
4.5.4	Resultados del estudio clínico	163
4.5.4.1	Resultados farmacocinéticos para EFV	164
4.5.4.2	Resultados farmacocinéticos para FTC	167
4.5.4.3	Resultados farmacocinéticos para TFV	170
4.6	Conclusiones.....	173

5. DESARROLLO, VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN DE 2 METODOLOGÍAS BIOANALÍTICAS POR LC-MS/MS (MS²) y LC/MS/MS/MS (MS³) PARA CUANTIFICAR LAMIVUDINA, NEVIRAPINA Y ZIDOVUDINA EN PLASMA HUMANO	176
5.1 Resumen	177
5.2 Introducción	178
5.2.1 Aspectos Farmacológicos y Farmacocinéticos	180
5.3 Objetivo	181
5.4 Experimental.....	182
5.5 Resultados y Discusión.....	184
5.5.1 Desarrollo de las metodologías bioanalíticas	184
5.5.1 Preparación de controles de calidad (CC)	187
5.5.2 Metodología de preparación de la recta de calibración	188
5.5.3 Resultados de la validación del método analítico.....	188
5.5.3.1 Efecto arrastre	188
5.5.3.2 Especificidad y linealidad	189
5.5.3.3 Precisión y Exactitud Intra e Inter día.....	192
5.5.3.4 Estabilidad en matriz	192
5.5.4 Comparación de las metodologías bioanalíticas de MS ² y MS ³	193
5.6 Conclusiones.....	195
6. CONCLUSIONES FINALES	196
Bibliografía	200

Índice de Tablas

Tabla 1.1: Fármacos antirretrovirales aprobados en la Unión Europea, octubre 2014.	32
Tabla 1.2: Parámetros farmacocinéticos en ensayos de BD comparada.	38
Tabla 1.3: Parámetros de estadística descriptiva.	44
Tabla 1.4: Criterios de aceptación de estadística inferencial en estudios de BE.	45
Tabla 1.5: Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.	49
Tabla 1.6: Características dominantes de los tipos de cromatografías líquidas.	52
Tabla 1.7: Parámetros básicos en HPLC.	59
Tabla 1.8: Técnicas de ionización más frecuentemente usadas en espectrometría de masas.	66
Tabla 1.9: Tipos de analizadores utilizados en espectrometría de masas.	72
Tabla 1.10: Comparación de analizadores de masas.	75
Tabla 1.11: Modos de escaneo en espectrómetros de masa de triple cuadrupolos.	81
Tabla 1.12: Contribuyentes comunes al efecto matriz en sangre.	83
Tabla 1.13: Constantes dieléctricas de algunos líquidos a 20 °C.	86
Tabla 1.14: Criterios de aceptación en validación de metodologías bioanalíticas.	95
Tabla 2.1: Equipamiento y materiales generales.	102
Tabla 2.2: Estándares analíticos.	102
Tabla 2.3: Reactivos.	102
Tabla 2.4: Material biológico.	103
Tabla 2.5: Condiciones cromatográficas T-009-TEC-15-V03.	107
Tabla 2.6: Datos analíticos de la recta de calibración de EFV en plasma humano.	109
Tabla 2.7: Regresiones lineales EFV en plasma humano.	110
Tabla 2.8: Preparación de controles de calidad de EFV.	111
Tabla 2.9: Precisión y veracidad Intra e Inter día.	112

Tabla 2.10: Resultados ensayo de recuperación EFV en plasma humano.	112
Tabla 2.11: Estabilidad en matriz.	113
Tabla 2.12: Resumen de cifras analíticas de mérito para cuantificar EFV en plasma humano por HPLC-UV.	114
Tabla 2.13: Metodologías por HPLC-UV para cuantificar EFV en plasma humano.	115
Tabla 2.14: Parámetros farmacocinéticos para cada voluntario.	118
Tabla 2.15: Cocientes Estudio/Referencia obtenidos con los valores In-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%.	119
Tabla 3.1: Equipamiento y materiales generales.	125
Tabla 3.2: Reactivos.	125
Tabla 3.3: Estándares analíticos.	126
Tabla 3.4: Material biológico.	126
Tabla 3.5: Información físico-química de ABC, EFV, 3TC y NFV.	127
Tabla 3.6: Parámetros del MS para detectar ABC, EFV, 3TC, NFV y NFV-d3.	129
Tabla 3.7: Condiciones cromatográficas para cuantificar ABC, 3TC, NFV y EFV en plasma humano por LC-MS/MS utilizando NFV-d3 como EI.	129
Tabla 3.8: Propiedades fisicoquímicas Tritón X-114.	132
Tabla 3.9: Datos experimentales de la recta de calibración para cuantificar ABC, 3TC, NFV y EFV en plasma humano por CPE con detección LC-MS/MS.	139
Tabla 3.10: Cifras analíticas de mérito de CPE-LC-ESI-MS/MS para el análisis de ABC, EFV, 3TC y NFV en plasma humano.	140
Tabla 3.11: Estabilidad de los ARVs en plasma humana a diferentes condiciones.	141
Tabla 3.12: Metodologías bioanalíticas para el análisis de ARVs en plasma humano.	142
Tabla 4.1: Reactivos.	148
Tabla 4.2: Estándares analíticos.	149

Tabla 4.3: Equipamiento y materiales generales.....	149
Tabla 4.4: Material Biológico.....	149
Tabla 4.5: Información físico-química de EFV, FTC y TFV.....	154
Tabla 4.6: Parámetros del MS/MS para cuantificar EFV, FTC, TFV y TFV-d7.....	154
Tabla 4.7: Condiciones cromatográficas para cuantificar EFV, FTC y TFV en plasma humano por LC-MS/MS utilizando TFV-d7 como EI.....	155
Tabla 4.8: Parámetros experimentales de la recta de calibración de EFV, FTC y TFV en plasma humano.....	156
Tabla 4.9: Controles de Calidad de EFV, FTC y TFV.....	162
Tabla 4.10: Estabilidad de los ARVs en plasma humana a diferentes condiciones.....	163
Tabla 4.11: Parámetros Farmacocinéticos de EFV para cada Voluntario.....	164
Tabla 4.12: Cocientes E/R obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%.....	166
Tabla 4.13: ANOVA para las fuentes de variabilidad de EFV.....	166
Tabla 4.14: Parámetros farmacocinéticos de FTC para cada voluntario.....	167
Tabla 4.15: Cocientes E/R obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%.....	169
Tabla 4.16: ANOVA para las fuentes de variabilidad de FTC.....	169
Tabla 4.17: Parámetros farmacocinéticos de TFV para cada voluntario.....	170
Tabla 4.18: Cocientes E/R obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%.....	172
Tabla 4.19: ANOVA para las fuentes de variabilidad de TFV.....	172
Tabla 5.1: Equipamiento y materiales generales.....	183
Tabla 5.2: Estándares analíticos.....	183
Tabla 5.3: Reactivos.....	183

Tabla 5.4: Material biológico.	183
Tabla 5.5: Información físico-química de 3TC, NVP, AZT y FTC.	184
Tabla 5.6: Parámetros del QTRAP [®] 5500 utilizados para cuantificar 3TC, NVP y AZT utilizando FTC como EI.	185
Tabla 5.7: Condiciones cromatográficas para cuantificar EFV, FTC y TFV en plasma humano por LC-MS/MS utilizando TFV-d ₇ como EI.....	187
Tabla 5.8: Controles de Calidad de EFV, FTC y TFV.	187
Tabla 5.9: Recta de calibración de 3TC, NVP y AZT en plasma humano.....	188
Tabla 5.10: Veracidad y precisión intra e inter día para determinar 3TC, NVP y AZT en plasma humano por MS ² y MS ³	192
Tabla 5.11: Estabilidad de los ARVs en plasma humana a diferentes condiciones.	193
Tabla 5.12: Cifras analíticas de mérito de las técnicas MS ² y MS ³ para la cuantificación de 3TC, NVP y AZT en plasma humano.	194

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1-A: Número de personas (en millones) portadoras del VIH a nivel mundial, 1990-2010 (WHO, UNICEF, y UNAIDS, 2011).....	29
Ilustración 1-B: Número de personas (en millones) infectadas con el VIH a nivel mundial, 1990-2010 (WHO y col., 2011).....	29
Ilustración 1-C: Número de personas (en millones) portadores del VIH, América Latina, 1990-2010 (WHO y col., 2011)	30
Ilustración 1-D: Número de personas que mueren por causas relacionadas con el SIDA, América Latina, 1990-2010 (WHO y col., 2011)	31
Ilustración 1-E: BD después de una administración oral	37
Ilustración 1-F: Diseño clásico cruzado, no replicado	40
Ilustración 1-G: Diseño Replicado de 2 Secuencias y 4 Períodos.....	40
Ilustración 1-H: Diseño Secuencial	41
Ilustración 1-I: Diseño de Estudio Paralelo.....	41
Ilustración 1-J: Esquema del equipo de HPLC.....	50
Ilustración 1-K: Selección de tipos de cromatografía de líquidos (Skoog y col., 2008).....	52
Ilustración 1-L: Cromatograma de un componente y parámetros más característicos	55
Ilustración 1-M: Cromatograma de dos analitos y parámetros correspondientes	58
Ilustración 1-N: Principales componentes de un espectrómetro de masas.	64
Ilustración 1-O: Componentes de la fuente de iones Turbo VTM (AB SCIEX®).	67
Ilustración 1-P: Interfaz de vacío (API 3200 AB Sciex) a presión atmosférica de bombeo de una sola etapa con gas cortina. El tamaño del orificio es aproximadamente 100 µm, Q0 actúa como un cuadrupolo de enfoque y el gas cortina (N ₂) previene que moléculas neutras se introduzcan en el espectrómetro de masas. La diferencia de presiones se debe al vacío proporcionado por la bomba mecánica.	68

Ilustración 1-Q: Esquema de Ionización por electronebulización.....	70
Ilustración 1-R: Diagrama que muestra los conceptos de resolución de pico y valle.	74
Ilustración 1-S: Sección transversal de un cuadrupolo (a) para la aproximación cilíndrica y (b) para el perfil hiperbólico de barras. El campo eléctrico es cero a lo largo de las líneas de puntos, es decir, a lo largo de las asíntotas en (b).....	76
Ilustración 1-T: (a) Esquema de un cuadrupolo; (b) fotografía de un cuadrupolo	77
Ilustración 1-U: Enfoque gráfico de la ecuación de Mathieu. Áreas de estabilidad en función de U y V para iones con masas diferentes ($m_1 < m_2 < m_3$).....	78
Ilustración 1-V: Diagrama de un instrumento de triple cuadrupolos. El primero y el último son analizadores de masas. El cuadrupolo central, q_2 , es una celda de colisión formada por un cuadrupolo usando solamente RF.	79
Ilustración 1-W: Camino de iones API 3200 TM (AB Sciex [®]).....	80
Ilustración 1-X: a) Formación de una micela por encima de su CMC, b) Formas de agregación de un surfactante.	88
Ilustración 2-A: a) Cromatogramas de los niveles de calibración superpuestos; b) Cromatogramas blanco de plasma (BPL), blanco de plasma fortificado con EI a una concentración de 9751 ng.mL ⁻¹ (Nivel 0) y plasma fortificado con EFV a una concentración de 50,7 ng.mL ⁻¹ (Nivel 1 de la recta de calibración).....	108
Ilustración 2-B: Regresión Lineal EFV día 1.	111
Ilustración 2-C: Perfiles de concentraciones plasmáticas promedio y barras de desviación estándar (N = 24) versus tiempo luego de administrar una dosis única de 600 mg de EFV de la Formulación de Estudio respecto al Producto de Referencia (Stocrin [®]) hasta las 192 h (gráfica superior) y hasta las 24 horas (gráfica inferior).	117
Ilustración 3-A: Cromatogramas y esquemas de las transiciones utilizadas en la cuantificación de los ARVs.	128
Ilustración 3-B: Superposición de cromatogramas de muestra de plasma fortificadas con 1,7, 1,2, 0,8, 1,9 y 1,9 µg.mL ⁻¹ de ABC, EFV, 3TC, NFV y NFV-d3 respectivamente.	130

Ilustración 3-C: Esquema de preparación de muestra por CPE para determinar ARVs en plasma humano por LC-MS/MS.....	131
Ilustración 3-D: Estructura química Tritón X-114, n = 7-8.....	131
Ilustración 3-E: Efecto en la respuesta relativa porcentual en función de la concentración de Tritón X-114 en la extracción de ARVs a partir de plasma humano.	133
Ilustración 3-F: Efecto del pH en la respuesta analítica de los ARVs fortificados en plasma humano a una concentración de 0,5 µg.mL ⁻¹	136
Ilustración 3-G: Efecto de modificadores en CPE en plasma humano sobre la respuesta analítica de 3TC, NFV, ABC y EFV.	138
Ilustración 4-A: a) Sorbente de extracción en fase sólida Oasis HLB [®] . b) Sorbente de extracción en fase sólida Oasis MCX [®]	157
Ilustración 4-B: Recuperación de la extracción de EFV, FTC, TFV y TFV-d ₇ a partir de 2 cartuchos de SPE, Oasis [®] HLB y Oasis [®] MCX en función de diferentes volúmenes de sus respectivos solventes de elución (MeOH para Oasis [®] HLB y NH ₄ OH 5% en MeOH para Oasis [®] MCX).....	157
Ilustración 4-C: Imagen del colector de vacío (Manifold VARIAN) utilizado para el proceso de extracción en fase sólida.....	158
Ilustración 4-D: Cromatogramas MRM para EFV, FTC, TFV y TFV-d ₇ en plasma humano correspondientes al BPL (izquierda) y LIC (derecha).....	160
Ilustración 4-E: Rectas de calibración de EFV, FTC y TFV en plasma, Intra día 1. .	161
Ilustración 4-F: Perfiles de concentraciones plasmáticas promedio y barras de desviación estándar (N = 24) de EFV versus tiempo luego de administrar una dosis única de 600/200/300 mg de una combinación a dosis fija de EFV/FTC/TDF de la formulación de Prueba, con respecto al producto de Referencia, Atripla [®] hasta las 192 h (gráfica superior) y hasta las 24 horas (gráfica inferior).....	165
Ilustración 4-G: Perfiles de concentraciones plasmáticas promedio y barras de desviación estándar (N = 24) de FTC versus tiempo luego de administrar una dosis única de 600/200/300 mg de una combinación a dosis fija de EFV/FTC/TDF	

de la formulación de Prueba, con respecto al producto de Referencia, Atripla® hasta las 24 h (gráfica superior) y hasta las 8 horas (gráfica inferior).....	168
Ilustración 4-H: Perfiles de concentraciones plasmáticas promedio y barras de desviación estándar (N = 24) de TFV versus tiempo luego de administrar una dosis única de 600/200/300 mg de una combinación a dosis fija de EFV/FTC/TDF de la Formulación de Prueba, con respecto al producto de Referencia, Atripla® hasta las 24 h (gráfica superior) y hasta las 6 horas (gráfica inferior).....	171
Ilustración 5-A: Camino de iones en el MS 5500 QTRAP® (SCIEX).	179
Ilustración 5-B: Esquema ejemplificando experimentos MS ² y MS ³ utilizando el espectrómetro de masas QTRAP® 5500.....	182
Ilustración 5-C: Espectros de masa obtenidos y asignaciones de fragmentos más importantes tanto para MS ² como para MS ³ de 3TC, NVP, AZT y FTC.	186
Ilustración 5-D: Blancos de plasmas y cromatogramas de la recta de calibración superpuestos de 3TC, NVP y AZT en la configuración de MS ²	189
Ilustración 5-E: Blancos de plasmas y cromatogramas de la recta de calibración superpuestos de 3TC, NVP y AZT en la configuración de MS ³	190
Ilustración 5-F: Rectas de calibración para 3TC, NVP y AZT en los experimentos MS ² y MS ³	191

Acrónimos y Abreviaturas

3TC:	Lamivudina
a :	Ordenada al origen de la calibración
ABC:	Abacavir
ACN:	Acetonitrilo
A_{EI} :	Área de estándar interno
AF:	Ácido fórmico
ANMAT:	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANOVA:	Análisis de la varianza (<i>ANalysis Of Variance</i>)
AZT:	Zidovudina
b :	Pendiente de la recta de calibración
BE:	Bioequivalencia
BPL:	Blanco de plasma (plasma procesado sin agregado de analito ni estándar interno)
$C_{ER\ Plasma}$:	Concentración de estándar de referencia en plasma
C_{ER} :	Concentración de estándar de referencia
CID:	Disociación inducida por colisión (<i>Collision Induced Dissociation</i>)
CPE:	Extracción de punto nube (<i>Cloud Point Extraction</i>)
C_{ST} :	Concentración de solución de trabajo
EFG:	Especialidad farmacéutica genérica
EFV:	Efavirenz
EI:	Estándar Interno
EMA:	Agencia Europea de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
ER:	Estándar de referencia
ESI:	Ionización por electronebulización (<i>Electrospray Ionization</i>)
FDA:	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

	<i>(Food and Drug Administration)</i>
FM:	Fase móvil
FTC:	Emtricitabina
GC-MS:	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LC-MS:	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masa
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LIC:	Límite inferior de cuantificación
LIT:	Trampa de iones lineal (<i>Linear Ion Trap</i>)
LLE:	Extracción líquido-líquido (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
<i>m/z</i> :	Relación masa/carga
MeOH:	Metanol
mg:	Miligramo
min:	Minuto
mL:	Mililitro
μL:	Microlitro
μm:	Micrómetro
MG:	Media geométrica
MRM:	Monitoreo de reacciones seleccionadas (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MS:	Espectrometría de masas
MS/MS:	Espectrometría de masas en tándem
NFV:	Nelfinavir
ng:	Nanogramo
PM:	Peso molecular
PP:	Precipitación de proteínas
Q:	Cuadripolo

QqLIT:	Espectrómetro de masas de triple cuadrupolos tándem donde el tercer cuadrupolo es una LIT
QqQ:	Espectrómetro de masas de triple cuadrupolos tándem
r :	Coefficiente de correlación
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIM:	Monitoreo de ión seleccionado (<i>Selected Ion Monitoring</i>)
SPE:	Extracción en fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SRM:	Monitoreo de reacción seleccionada (<i>Selected Reaction Monitoring</i>)
ST:	Solución de trabajo
TARGA:	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TDF:	Tenofovir Disoproxil Fumarato
TFV:	Tenofovir
t_R :	Tiempo de retención
UV:	Ultravioleta
V :	Volumen
VIH:	Virus de inmunodeficiencia humana

Resumen

Desde que los primeros casos de SIDA comenzaron a surgir en 1981, se han realizado varios intentos de combatir la enfermedad. A finales de 2009, se estimaba que 33,3 millones de personas en todo el mundo estaban infectadas con el VIH, en comparación con 26,2 millones en 1999, lo cual significa un aumento del 27% en sólo 10 años. Sin embargo, el número de infecciones por el VIH recientemente diagnosticadas tiende a estabilizarse y ha disminuido desde 1990. Se estima que 25 millones de personas han muerto de una causa relacionada con el SIDA desde que se declaró el primer brote de la enfermedad. Sin embargo, el número de muertes relacionadas con la patogenicidad del VIH también se ha reducido gracias a los avances en el diagnóstico, los tratamientos y el seguimiento cuidadoso del paciente. En los últimos 10 años, la disponibilidad de nuevos fármacos antirretrovirales (ARV), más potentes y altamente específicos ha sido un gran avance en la supervivencia de los pacientes. En particular, el uso combinado de tres a cuatro ARVs diferentes, en lo que se conoce como Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA), ha mejorado el estado clínico y el pronóstico de la mayoría de los pacientes infectados por el VIH, reduciendo su morbilidad y mortalidad. En este sentido, la generalización del TARGA ha llevado a una marcada disminución de infecciones oportunistas y enfermedades relacionadas con el SIDA en pacientes infectados por el VIH, mejorando su calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, el TARGA requiere un alto grado de adherencia al tratamiento para que alcance su máxima eficacia.

El concepto genérico de Especialidad Farmacéutica Genérica (EFG), también conocido como medicamento genérico, se refiere a un medicamento con el mismo Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) que otro medicamento de referencia conocido como el innovador o medicamento de marca. Los medicamentos genéricos son una alternativa mucho más asequible a los medicamentos de referencia o innovadores, concebidos para reemplazar a estos últimos en el tratamiento de los pacientes. Un fármaco genérico se formula en la misma forma farmacéutica y contiene aproximadamente los mismos excipientes cualitativos y cuantitativos (ingredientes no activos) que el producto de referencia. Para probar la seguridad y la eficacia en el tratamiento, los medicamentos innovadores soportan un período de 10 a 15 años de estudios de desarrollo, incluyendo diversas fases de ensayos clínicos en cientos de

sujetos para probar el desempeño del fármaco antes de llegar a los pacientes. Por el contrario, para garantizar la seguridad y la eficacia en la atención al paciente, los medicamentos genéricos deben demostrar bioequivalencia al producto de referencia, cumpliendo con pruebas igualmente estrictas (in vitro e in vivo) pero en menor tiempo, diseñadas para asegurar la intercambiabilidad con respecto al producto de referencia.

Los estudios de bioequivalencia se han convertido en el estándar mundial para demostrar que un medicamento genérico tiene la misma eficacia terapéutica y perfil de seguridad que el medicamento de referencia o innovador. Estos estudios se basan en la caracterización comparativa de los perfiles farmacocinéticos del IFA en fluidos biológicos de sujetos humanos después de la ingestión de cualquiera de los productos. La bioequivalencia se basa en la premisa de que si el mismo IFA contenido en dos medicamentos similares (medicamentos genéricos y de referencia) se encuentra en sangre con la misma proporción y extensión, la misma concentración del IFA llegará probablemente al sitio u órgano blanco donde el fármaco ejerce su actividad farmacológica y, por lo tanto, se podría esperar un efecto terapéutico muy similar para ambos productos. Con el fin de establecer la bioequivalencia entre las dos formulaciones, la hipótesis de similitud de los perfiles farmacocinéticos debe ser probada con rigor estadístico. Esto se logra midiendo ciertos parámetros farmacocinéticos en humanos y sometiendo estos parámetros a un análisis estadístico riguroso. La validez de tales pruebas estadísticas, en las que la bioequivalencia puede o no ser reivindicada, depende en gran medida de la precisión y sesgo de la medición de los parámetros farmacocinéticos y a menudo requiere la determinación de nanogramos o incluso picogramos de fármacos o sus metabolitos en matrices biológicas complejas tales como sangre, plasma u orina. Por esta razón, la fiabilidad de los resultados analíticos es uno de los factores más críticos en los estudios farmacocinéticos de los ensayos de bioequivalencia.

El objetivo general de éste trabajo de tesis fue desarrollar y validar metodologías analíticas altamente sensibles para la evaluación farmacocinética simultánea de varios ARVs. Estas metodologías son requeridas para demostrar la bioequivalencia de los ARV genéricos con la intención final de proporcionar medicamentos más asequibles pero igualmente eficaces para tratar a los pacientes de SIDA con TARGA. Para ello, se desarrollaron y validaron diferentes metodologías bioanalíticas utilizando HPLC con detección UV y espectrometría de masas en tándem (MS^2 y MS^3). Las metodologías de

HPLC-MS/MS, permitieron cuantificar varios ARVs simultáneamente y resultaron muy eficientes en términos de análisis de un gran número de muestras. Diferentes métodos de procesamiento de muestras permitieron cuantificar diferentes ARVs en el mismo análisis con adecuado sesgo y precisión. Las metodologías desarrolladas y validadas en este trabajo de tesis se aplicaron en estudios de bioequivalencia de fármacos ARVs, para los cuales se obtuvieron perfiles farmacocinéticos de diferentes ARV en voluntarios argentinos sanos. Nuestros resultados muestran que no todas las formulaciones farmacéuticas de ARVs son intercambiables en la práctica médica, y los estudios de bioequivalencia son por lo tanto un paso final muy importante en la línea de garantía de calidad de productos farmacéuticos genéricos antes de llegar a los pacientes.

Este trabajo de tesis está dividido en seis capítulos. El primer capítulo corresponde a una introducción general; presenta aspectos relevantes del uso de ARVs en las terapias del SIDA, introduce conceptos de química analítica instrumental tales como cromatografía acoplada a detectores de UV y MS, estudios comparativos de farmacocinética, criterios de bioequivalencia para demostrar la intercambiabilidad de productos farmacéuticos, requisitos de validación de métodos bioanalíticos culminando con la presentación de los objetivos del trabajo de tesis. A continuación se presentan los capítulos de introducción, métodos, resultados y discusión para cada uno de los estudios realizados, cada uno de ellos con sus conclusiones correspondientes. Finalmente, el sexto y último capítulo presenta las conclusiones finales de la tesis.

Abstract

Since the first AIDS cases began to arise in 1981, there have been several attempts to fight the disease. By the end of 2009, an estimated 33.3 million people worldwide were infected with HIV, compared to 26.2 million in 1999, an increase of 27% in just 10 years. However, the number of newly diagnosed HIV infections tends to stabilize and has indeed declined since 1990. It is estimated that 25 million people have died of an AIDS-related cause since the first outbreak of the disease was declared. However, the number of deaths linked to HIV pathogenicity has also been reduced thanks to advances in diagnosis, treatments and careful patient follow-up. In the last 10 years the availability of novel, more potent and highly specific Anti-RetroViral drugs (ARV) has been a major breakthrough in patient survival. In particular, the combined use of three to four different ARVs, in what is known as Highly Active Anti-Retroviral Therapies (HAART), has improved the clinical status and prognosis of most HIV-infected patients, reducing their morbidity and mortality. In this regard, the generalization of HAART has led to a marked decrease in opportunistic infections and AIDS-related diseases in HIV infected patients, improving life quality of patients. Nonetheless, HAART requires for its effectiveness a high degree of adherence to treatment.

The concept of Generic Pharmaceutical Specialty (GPS), also known as generic drug, refers to a medicinal product with the same active pharmaceutical ingredient (API) as another medicinal product of reference, known as the Innovator or Brand-name drug. Generic drugs are a much more affordable alternative to brand-name drugs, conceived to replace reference products in patient treatment. A generic drug is formulated in the same pharmaceutical form and contains approximately the same qualitative and quantitative excipients (non-active ingredients) as the reference product. To test safety and efficacy in the treatment, innovator drugs endure a 10 to 15 year-long period of developmental studies, including three phases of clinical trials in hundreds of subjects to test the drug performance before reaching the patients. On the contrary, in order to assure safety and efficacy in patient care, generic drugs need to demonstrate bioequivalence to the reference product, complying with equally stringent but less time consuming in vitro and in vivo tests designed to assure interchangeability with respect to the reference product.

Bioequivalence studies have become worldwide the gold standard to demonstrate that a generic drug has the same therapeutic efficacy and security profile as the innovative reference drug. These studies rely on the comparative characterization of the pharmacokinetic profiles for the API in biological fluids of human subjects after ingestion of either of the products. Bioequivalence is based on the premise that if the same API contained in two similar medicines (generic and reference drugs) is absorbed in blood with the same rate and extent, the same concentration of pharmaceutical product will likely arrive to the target site or organ where the drug exerts its pharmacological activity, and therefore, a highly similar therapeutic effect could be expected for both products.

In order to establish bioequivalence between the two formulations, the hypothesis of similarity of pharmacokinetic profiles should be tested with statistical power. This is achieved by measuring certain pharmacokinetic parameters in tests subjects, and subjecting these parameters to a rigorous statistical analysis. The validity of such statistical tests, on which Bioequivalence could or could not be claimed, heavily relies on the precision and accuracy of the measurement of the pharmacokinetics parameters, and often requires the determination of nanograms or even picograms of drugs, or its metabolites, in complex bio-matrices such as blood, plasma or urine. For this reason, reliability of the analytical results is one of the most critical factors in pharmacokinetic studies of bioequivalence trials.

The general objective of this thesis work was to develop and validate highly sensitive analytical methodologies for the simultaneous pharmacokinetic evaluation of several ARVs. Such methodologies are in demand for testing bioequivalence of generic ARVs with the final intention of providing more affordable but equally effective medicines for treating AIDS patients with HAARTs. To this aim, different bioanalytical methodologies were developed and validated by using HPLC with both UV detection and tandem mass spectrometry (MS^2 and MS^3). The HPLC-UV methodology showed a better performance in terms of chromatographic separation due to detector characteristics. HPLC-MS/MS methodologies, allowed to quantify several ARVs simultaneously and resulted very efficient in terms of analysis of a large number of samples. Different sample processing methods allowed quantifying different ARVs in the same analytical run with accuracy and precision. The methodologies developed and validated in this thesis work were proven successful in a Bioequivalence study of a

HAART generic formulation, for which pharmacokinetic profiles of different ARVs were obtained in healthy Argentinean volunteers. Our results show that not all pharmaceutical formulations of ARVs are interchangeable in medical practice, and bioequivalence studies are therefore a very important final step in the quality assurance pipeline of generic pharmaceuticals before reaching the patients.

This thesis manuscript is divided into six chapters. The first chapter corresponds to a general introduction; it presents relevant aspects of the usage of ARVs in AIDS therapies, introduces concepts of instrumental analytical chemistry such as chromatography coupled to UV and MS detectors, comparative pharmacokinetic studies, bioequivalence criteria to demonstrate interchangeability of pharmaceuticals, validation requirements for bioanalytical methods, and ends with the presentation of the objectives of the thesis work. Following chapters present introduction, methods, results and discussion for each of the studies carried out, each of them with their corresponding conclusions. Finally, the sixth and last chapter presents the final conclusions of the thesis.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción VIH-SIDA

1.1.1 Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

A mediados de la década del 70, jóvenes homosexuales aparentemente saludables empiezan a ser diagnosticados con una rara forma de cáncer en la piel llamado Sarcoma de Kaposi, que usualmente solo afectaba a pacientes ancianos, y de una rara infección pulmonar, llamada neumonía por *Neumocistis carinii*.

En el verano de 1981 los Centros para la Prevención y el Control de Enfermedades (CDC por *Centers for Disease Control and Prevention*) comunicaron la aparición inexplicable de neumonía *Pneumocystis jiroveci* (antes denominada *carinii*), enfermedad oportunista, en cinco varones homosexuales previamente sanos de la ciudad de Los Ángeles y del sarcoma de Kaposi en veintiséis varones homosexuales previamente sanos en las ciudades de Nueva York y Los Ángeles, en EEUU.

En 1982, Robert Gallo del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos describió a los retrovirus humanos de la misma familia en pacientes afectados por una variedad poco común de leucemia y los llamó HTLV-1 y HTLV-2 (H por humano, T por linfocito T, L por leucemia, y V por virus). Este mismo año, el CDC reporta la presencia de la enfermedad en haitianos y hemofílicos y concluye que el síndrome es transmitido por agente infeccioso y decide llamarlo SIDA (síndrome inmunodeficiencia adquirida) y comienza a ser considerada como una epidemia no solo de los homosexuales.

Una vez conocidos los primeros casos de SIDA, se iniciaron las labores científicas destinadas a conocer más características de la enfermedad, esta situación hizo pensar que la causaba un agente que se transmitía por la sangre y el acto sexual. En 1983 el Dr. Montagnier, del Instituto Louis Pasteur de París, identificó un retrovirus al que denominó LAV (siglas en inglés de “virus asociado a linfadenopatía”). En 1984 el Dr. Robert Gallo del NIH (National Institute of Health - EEUU) afirmó descubrir el agente causal del SIDA al que llamó HTLV-III (siglas en inglés de “virus linfotrópico a células T humanas tipo 3”), y a fines del mismo año el Dr. Jay Levy de la Universidad de California, San Francisco, EEUU, aisló al virus denominándolo ARV por siglas en inglés de “virus relacionado al SIDA” (Maravilla y Jiménez, 2004). Todos estos nombres se dieron al mismo virus casi simultáneamente por diversos investigadores y en distintas partes del mundo. En mayo de 1986 el Comité Internacional para la

Taxonomía de los Virus recomendó que al virus causal del SIDA se le denominara “virus de inmunodeficiencia humana (VIH)” señalando con ello la acción del virus y su huésped específico.

1.1.2 Epidemiología

A nivel mundial, el número anual de personas infectadas con el VIH sigue disminuyendo, aunque esto varía mucho entre regiones. En el año 2010 se estimó que 2,7 millones personas se infectaron con el VIH, un 15% menos que los 3,1 millones personas infectadas en 2001 y más de un quinto (21%) menos que los 3,4 millones reportados en 1997. (Ilustración 1-A e Ilustración 1-B).

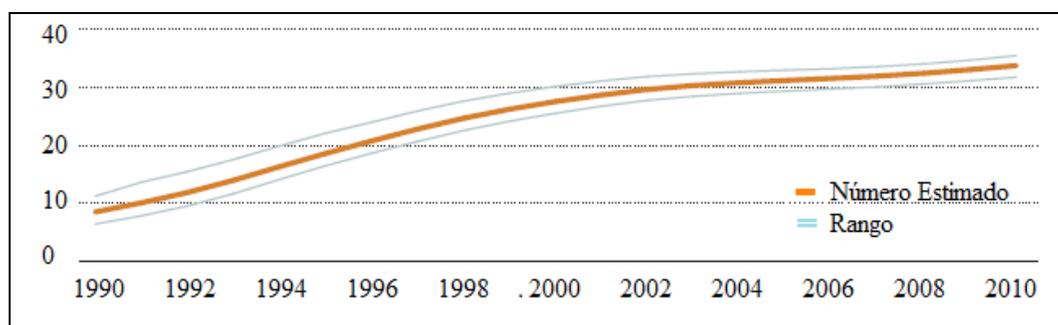


Ilustración 1-A: Número de personas (en millones) portadoras del VIH a nivel mundial, 1990-2010 (WHO, UNICEF, y UNAIDS, 2011)

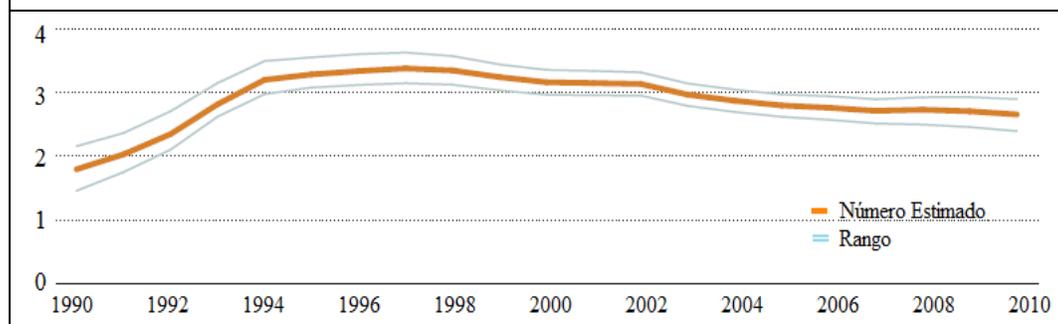


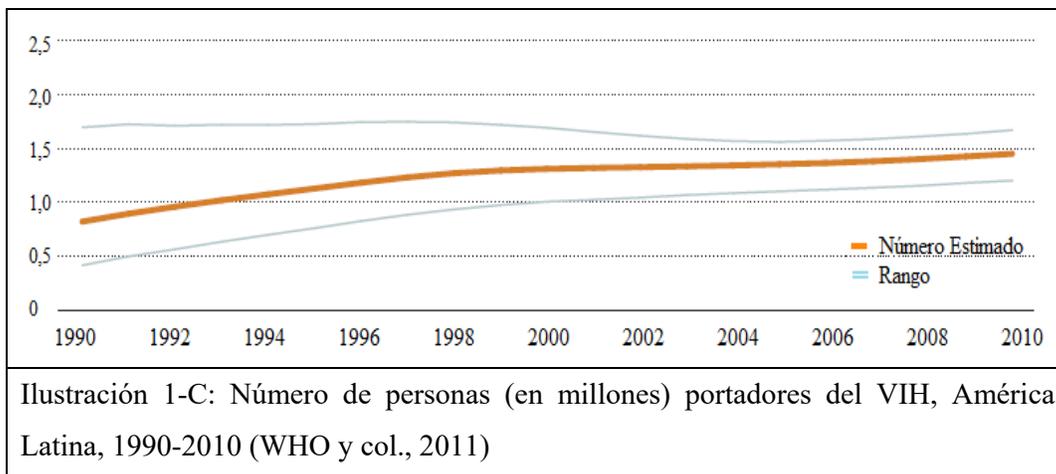
Ilustración 1-B: Número de personas (en millones) infectadas con el VIH a nivel mundial, 1990-2010 (WHO y col., 2011).

Entre los años 2001 y 2009, la incidencia de la infección por el VIH ha disminuido en 33 países, 22 de ellos en África subsahariana. En esta región, que continúa teniendo la mayoría de las personas recientemente infectadas, se calcula que 1,9 millones de personas se infectaron en el año 2010. Esto representa un 16% menos que los estimados 2,2 millones de personas infectadas con el VIH en 2001 y un 26% menos que el número anual de personas infectadas en 1997 (cuando la incidencia general del VIH en el África subsahariana alcanzó su máximo). En Asia meridional y

sudoriental, las estimadas 270.000 personas infectadas con el VIH en 2010 fueron un 40% menos que las 470.000 personas que se estima habían contraído el VIH en 1996, cuando la epidemia en esa subregión alcanzó su punto máximo.

Estas tendencias decrecientes en el número de infectados reflejan una combinación de factores: el curso natural de las epidemias de VIH, los cambios de comportamiento asociados con una mayor concientización sobre los efectos de las epidemias y los esfuerzos de prevención y el aumento de la cobertura de la terapia antirretroviral.

En términos generales puede considerarse que la epidemia de VIH en América Latina se ha estabilizado. El número anual de nuevos infectados con VIH ha disminuido a una tasa constante hasta el año 2000 (Ilustración 1-C). Desde entonces, el número anual estimado de personas que contraen el VIH se ha estabilizado con pequeñas fluctuaciones entre 75.000 - 130.000 y 73.000 - 140.000 (este último rango para 2010). Aunque estabilizado, el número total de personas que viven con el VIH en esta región continúa incrementándose y alcanzó los 1,5 millones en el 2010, frente a 1,3 millones en el 2001. Este aumento es, en parte, atribuido al aumento del número de personas portadoras del VIH que reciben terapia antirretroviral, lo que ha ayudado a reducir el número anual de personas que mueren por causas relacionadas con el SIDA a 45.000 – 92.000 en 2010, frente a un máximo de 50.000 – 130.000 en 2001-2003 (Ilustración 1-D). El 36% de los adultos que viven con el VIH en esta región en 2010 son mujeres. El número de niños menores de 15 años que viven con el VIH, recién infectados y que murieron por causas relacionadas con el SIDA ha disminuido entre el 2001 y 2010 (WHO y col., 2011).



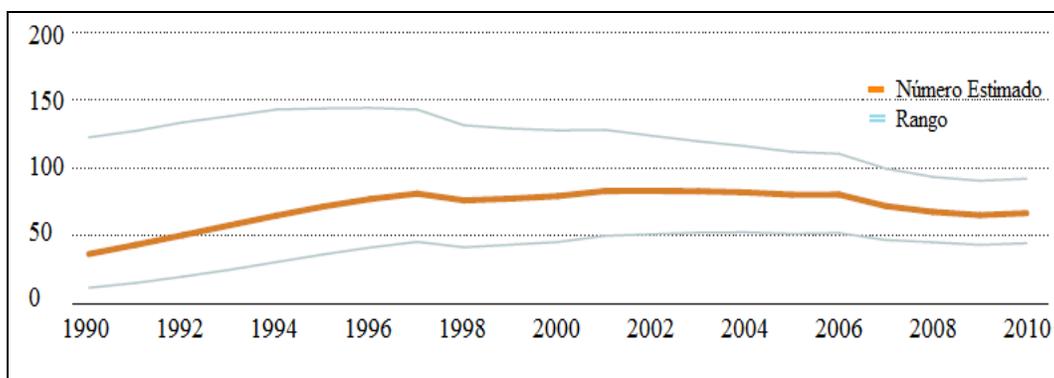


Ilustración 1-D: Número de personas que mueren por causas relacionadas con el SIDA, América Latina, 1990-2010 (WHO y col., 2011)

Brasil, el país más poblado de América Latina, alberga alrededor de un tercio de las personas que viven con el VIH en América Central y del Sur, sin embargo, la prevalencia de VIH en adultos nunca ha alcanzado el 1%. Una respuesta temprana bien coordinada, la protección de los derechos humanos y un enfoque en la prevención de la infección por el VIH mediante grandes programas de información destinado a varones que tienen relaciones homosexuales, personas que se inyectan drogas y trabajadoras sexuales ayudaron a Brasil a evitar una epidemia de VIH potencialmente mucho mayor (WHO y col., 2011).

1.1.3 Antirretrovirales utilizados en el tratamiento por infección de VIH

En 1987 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (US-FDA) aprobó el primer medicamento para tratar a los enfermos de SIDA: la Zidovudina (Azidotimidina o AZT), fabricada por los laboratorios Wellcome Ltd. bajo el nombre comercial de Retrovir. Este medicamento no cura el SIDA, pero mejora el estado general y la supervivencia a corto plazo del paciente al retrasar la progresión de la infección hacia la enfermedad propiamente dicha. El AZT actúa directamente sobre el VIH bloqueando la transcriptasa reversa, enzima sin la cual el virus no puede replicarse. En marzo de 1990 la FDA permitió la administración de dosis de 500 mg por día a pacientes asintomáticos o con síntomas leves y con menos de 500 células CD4 por mm^3 . En agosto de 1992 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó nuevas indicaciones del AZT para pacientes asintomáticos con menos de 200 células CD4 por mm^3 . En dosis altas (1.500 mg por día) este medicamento produce efectos colaterales peligrosos en algunos pacientes (erupciones cutáneas, náuseas, insomnio, mialgia y confusión, hepatotoxicidad celular, anemia severa, granulocitopenia y trombocitopenia).

A pesar del alto costo del AZT, este sigue siendo en algunos pacientes el medicamento de primera elección para individuos infectados con el VIH.

En 1995, la FDA aprobó el primer medicamento de la clase de los inhibidores de proteasas (IP), el Invirase (Saquinavir). En los siguientes años, fueron aprobados dos IPs más, el Norvir (Ritonavir) y Crixivan (Indinavir), junto con otras nuevas clases de drogas, los inhibidores no-nucleósidos de la transcriptasa reversa (INNTR), entre los que se encuentran Sustiva (Efarivenz) y Viramune (Nevirapine) (USFDA, 2014a). En la Tabla 1.1 se presentan los fármacos antirretrovirales aprobados en la Unión Europea (“Grupo de trabajo sobre tratamientos del VIH (gTt),” 2014).

Tabla 1.1: Fármacos antirretrovirales aprobados en la Unión Europea, octubre 2014.

Clasificación	Principio Activo	Nombre Comercial
Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido (ITIAN)	Abacavir (ABC)	Ziagen®
	Emtricitabina (FTC)	Emtriva®
	Lamivudina (3TC)	Epivir®
	Zidovudina (AZT)	Retrovir®
Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótido (ITIANt)	Tenofovir Disoproxil Fumarato (TDF)	Viread®
Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (ITINAN)	Efavirenz	Sustiva Stocrin®
	Etavirina	Intelence®
	Nevirapina	Viramune®
	Rilpivirina	Edurant®
Inhibidores de la Proteasa (IP)	Atazanavir	Reyataz®
	Darunavir	Prezsta®
	Fosamprenavir	Telzir®
	Lopinavir + Ritonavir (LPV/r)	Kaletra®
	Ritonavir (RTV)	Norvir®
Inhibidores del CCR5	Saquinavir (SQV)	Invirase®
	Tipranavir	Aptivus®
	Maraviroc	Celsentri®
Inhibidores de la Integrasa	Dolutegravir	Tivicay®
	Elvitegravir	Vitekta®
	Saquinavir	Invirase®

En 1996, la Conferencia Internacional de SIDA, revela que el Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA) el cual combina tres drogas, es extremadamente efectivo en reducir la cantidad de actividad viral en la sangre y causa una significativa mejoría de la inmunidad en los pacientes tratados. Esta terapia representa un hito en la lucha contra esta enfermedad, comenzando la era de VIH como una enfermedad crónica manejable (Aggleton y Mazín, 2000).

1.1.4 Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA)

La infección por VIH y el SIDA son consideradas como una patología de alto costo, por generar un fuerte impacto económico sobre las finanzas y por causar un dramático efecto sobre la calidad de vida del paciente y su familia, incluida las repercusiones laborales.

La base del TARGA reside en el empleo de una combinación de fármacos que atacan en diferentes etapas del ciclo de replicación viral o diferentes aspectos del mismo, generando una inhibición más eficaz del proceso viral y su replicación. Este tratamiento consiste, fundamentalmente, en una combinación de fármacos que se engloban dentro de tres grupos de antirretrovirales: ITIAN, ITINAN e IP. El uso combinado de estos tres tipos de fármacos en las fases iniciales de la infección, cuando la cantidad de virus es escasa, hace que el tratamiento sea más eficaz.

Con el fin de simplificar el tratamiento de TARGA e incrementar la adherencia al mismo, varias compañías farmacéuticas han desarrollado formulaciones que combinan los principios activos de varios tipos de antirretrovirales en un solo comprimido o tableta. Estos, se denominan Combinaciones de Antirretrovirales a Dosis Fijas (CADF) o “combos”. Cuando se diseñan CADF deben cumplirse una serie de premisas para asegurar su eficacia a largo plazo, como no presentar toxicidades similares o aditivas, no requerir ajustes individuales de dosis y presentar características farmacocinéticas concordantes. Esto último se refiere no sólo a su frecuencia de administración, sino a la semivida de eliminación, muy importante cuando el paciente omite alguna dosis o interrumpe el tratamiento (Llibre y col., 2010). Actualmente, en nuestro país, se dispone de las siguientes CADF: AZT/3TC (Combivir®), AZT/3TC/ABC (Trizivir®), TDF/FTC (Truvada®), EFV/TDF/FTC (Atripla®), ABC/3TC (Kivexa®) y Lopinavir/Ritonavir (Kaletra®).

El TARGA ha aumentado la supervivencia de los pacientes con infección por el VIH, sobre todo de aquellos con inmunodepresión grave ya que consigue controlar la replicación viral, retrasando la progresión clínica de la infección y mejorando de forma significativa la calidad de vida del paciente. La obtención de estos beneficios requiere mantener un elevado nivel de adherencia a la terapia prescrita; por el contrario, una baja adhesión origina un rebrote de la actividad viral que incluso podría desarrollar rápidamente resistencia a los fármacos, tras la selección de mutantes naturales resistentes. Esto tiene como consecuencia para el paciente el avance de la infección y la dificultad para encontrar posteriores tratamientos de la misma eficacia, lo cual se traduce en una mayor morbilidad y mortalidad y en el riesgo de transmisión de cepas resistentes a la población.

Desde el advenimiento del TARGA, un número significativo de personas con VIH han tenido vidas prolongadas y saludables, por lo que el TARGA se ha definido como el estándar de cuidado. A pesar de estos avances, el TARGA no está exento de problemas. La adhesión casi perfecta de medicamentos para el VIH es crítica para el éxito del tratamiento, en particular para la prevención de la replicación viral. El cumplimiento parcial no es suficiente, ya que existen evidencias muy marcadas en el grado de supresión viral en función del nivel de adherencia, diferencias que serían aceptables para otras condiciones médicas.

1.2 Investigación clínica en humanos

La investigación en salud humana constituye un paso básico para que los medicamentos y los nuevos tratamientos lleguen a quienes los necesitan. Además, sin investigación no habría propuestas mejoradoras para la prevención y tratamiento de las enfermedades.

La regulación de la investigación clínica en Argentina es llevada a cabo por la ANMAT (Decreto 150/1992, Resolución del Ministerio de Salud 1480/2011). Las normas que establecen el Régimen de Buenas Prácticas Clínica para Estudios de Farmacología Clínica y de Tecnología Médica están incluidas en las Disposiciones 6677/2010 y 969/1997.

La ANMAT es el organismo encargado de la autorización y el control de las investigaciones clínicas experimentales en medicamentos y productos médicos, y de la elaboración de la normativa que regula la actividad de investigación. Para la aprobación

de un ensayo clínico se evalúa que el proyecto cumpla las normas nacionales e internacionales, tanto desde el punto de vista científico como ético. Cada vez que se acude a una farmacia a comprar un medicamento o producto médico, es porque éstos han pasado por rigurosas pruebas y controles necesarios para poder ser dispensados a pacientes.

Dentro del campo de los estudios clínicos, la farmacología clínica es la especialidad médica que evalúa los efectos de los fármacos en los seres humanos a través de estudios sistemáticos científicos realizados sobre Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA). Su objetivo es descubrir o verificar los efectos terapéuticos (eficacia), identificar reacciones adversas (seguridad) y/o estudiar la absorción, distribución, metabolismo (biotransformación) y excreción de los IFA.

Los estudios de farmacología clínica son clasificados en cuatro fases y para su funcionamiento requieren determinadas características que se amplían a continuación (SAFYBI, 2016):

Fase I: Introducción inicial de un nuevo IFA en seres humanos para determinar su metabolismo, acciones farmacológicas, efectos secundarios con dosis crecientes y, si fuera posible, de obtener evidencia temprana sobre la eficacia. Incluye el estudio de variaciones entre sub-poblaciones e interacciones con ingesta de alimentos u otros fármacos. Estos estudios fundamentan el uso del producto en las fases sucesivas. Típicamente, los estudios de Fase I son monitoreados muy cercanamente y pueden ser llevados a cabo en sujetos voluntarios sanos o en alguna ocasión en pacientes.

Fase II: En esta fase se determinan la eficacia y la seguridad de diferentes rangos de dosis. De ser posible, también, se establecen las relaciones dosis-respuesta, con el objeto de obtener sólidos antecedentes para el diseño de estudios terapéuticos ampliados (Fase III).

Fase III: Estudios realizados en grandes y variados grupos de participantes con el objetivo de determinar tanto el balance beneficio-riesgo a corto y largo plazo de la o las formulaciones propuestas como el valor terapéutico relativo de manera general. Se exploran el tipo y perfil de las reacciones adversas más frecuentes y las características especiales del IFA como, por ejemplo, las interacciones clínicamente relevantes y los factores modificatorios principales del efecto, tales como la edad, etc.

Fase IV: Estudios llevados a cabo luego de aprobada la comercialización del medicamento para establecer el valor terapéutico, aparición de nuevas reacciones adversas y/o confirmación de la frecuencia de las conocidas y las estrategias de tratamiento.

1.2.1 Farmacocinética: conceptos y parámetros.

Se llama biodisponibilidad (BD) al grado fraccionario en que una dosis de fármaco llega a su sitio de acción, o un líquido biológico desde el cual tiene acceso a dicho sitio (Flexner, 2007). La BD caracteriza la velocidad y proporción con la cual el principio activo de un medicamento alcanza la circulación sistémica luego de su administración, la cual se relaciona directamente con la cantidad de droga que llega al sitio de acción, siendo este un indicador de su eficacia.

Cuando un fármaco es administrado por una vía extravascular, existe siempre una fracción de la dosis que no ingresa a circulación sistémica. El requerimiento de un estudio de biodisponibilidad de un fármaco para comprobar eficacia y seguridad, se basa en el hecho de que la velocidad de ingreso del fármaco a la circulación sistémica puede diferir de una formulación a otra o de una vía de administración a otra.

Cuando se estudia la BD de un fármaco, se debe entonces determinar la proporción de la dosis que ingresó a la circulación general y la velocidad de este ingreso. La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo.

El destino farmacocinético de una dosis de medicamento, determinado mediante la medición repetida de su concentración sanguínea después de una sola administración, proporciona información útil para desarrollar un concepto o “modelo” de la manera en que el cuerpo procesa dicho fármaco (Katzung BG, 1994; Benet LZ, 2010). Las concentraciones alcanzadas dependen de la cantidad de droga administrada, el grado y velocidad de su absorción, distribución, unión o depósito en los tejidos, biotransformación y excreción. Es por ello que se plantea que los cuatro componentes básicos de la farmacocinética son: Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (LADME).

Luego de la administración oral de un medicamento, mientras predomina la absorción, se manifiesta un aumento de la concentración vascular del fármaco. Este incremento de la concentración progresa hasta alcanzar un punto en el que la velocidad de absorción se equipara a la velocidad de desaparición del mismo en sangre (por

distribución o eliminación). En este punto se alcanza el pico de concentración plasmática del fármaco en sangre y es conocido como su concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$). El tiempo que cada fármaco necesita para alcanzar su $C_{m\acute{a}x}$ se conoce como $T_{m\acute{a}x}$. Luego de alcanzada la $C_{m\acute{a}x}$ comienza a decrecer la concentración del fármaco de forma exponencial hasta lograrse la eliminación completa del mismo (aclaramiento plasmático). El proceso de aclaramiento está caracterizado por una constante de eliminación del fármaco (k_{el}) y por un tiempo medio de eliminación ($T_{1/2}$). Estos cuatro parámetros caracterizan la curva farmacocinética del fármaco, es decir la variación temporal de la concentración sanguínea del mismo. El Área Bajo la Curva farmacocinética (ABC) es un parámetro complementario que cuantifica la exposición total al fármaco durante la dosis administrada (Ilustración 1-E).

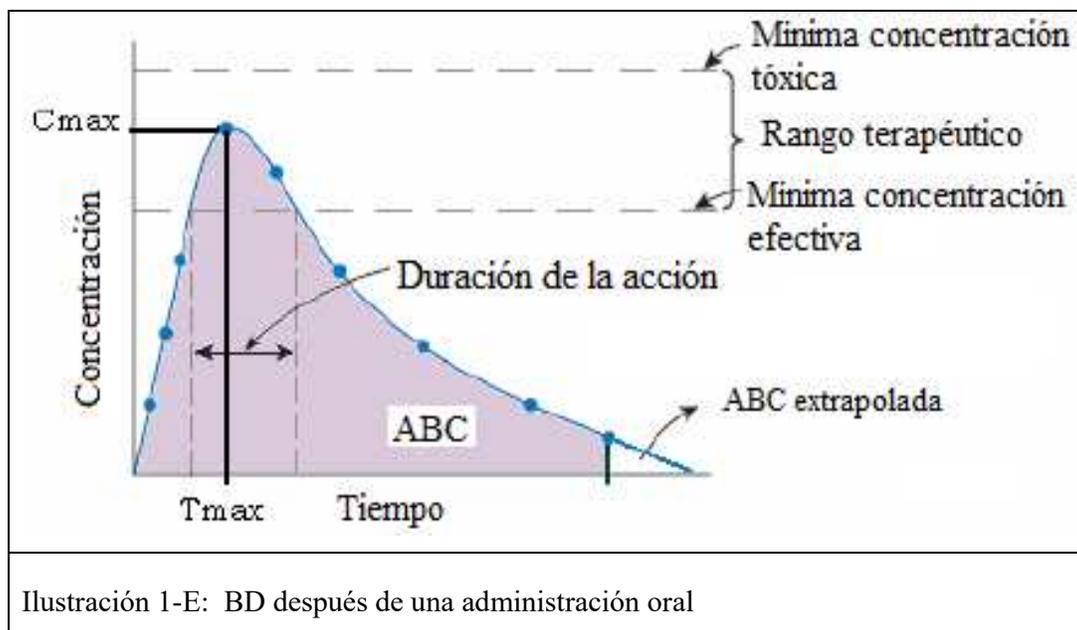


Ilustración 1-E: BD después de una administración oral

EL ABC se usa para estimar la cantidad de fármaco ingresado a la circulación general. Su uso se fundamenta en el hecho que, a los niveles de dosificación empleados corrientemente, existe una relación lineal entre el valor del ABC y la cantidad de fármaco ingresado a la circulación general.

La $C_{m\acute{a}x}$ observada es un indicador tanto de la cantidad de fármaco ingresado a la circulación general como de la velocidad de ingreso. Si consideramos dos formulaciones que contengan el mismo principio activo y ambas presentan idéntica cantidad de fármaco ingresado a la circulación general, el valor de $C_{m\acute{a}x}$ será mayor en el fármaco que presenta una velocidad de ingreso mayor.

El tiempo al que se observa la máxima concentración plasmática es un indicador relativo de la velocidad de ingreso del fármaco a la circulación general. El fundamento del uso de este parámetro se basa en que, si el ingreso del fármaco se produce a gran velocidad, el $T_{m\acute{a}x}$ ocurre tempranamente. En la Tabla 1.2 se resumen los parámetros farmacocinéticos más relevantes utilizados en los estudios de BD de fármacos.

Tabla 1.2: Parámetros farmacocinéticos en ensayos de BD comparada.

Parámetro farmacocinético	Definición
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración plasmática máxima
ABC_{0-t}	Área bajo la curva de concentración plasmática entre 0 y t (tiempo al cual se puede obtener un resultado de concentración exacto y preciso).
$ABC_{0-\infty}$:	Área bajo la curva de concentración plasmática entre 0 e infinito. $ABC_{0-\infty} = ABC_{0-t} + Ct/k_{el}$, donde Ct es la última concentración cuantificable.
$T_{m\acute{a}x}$	Tiempo para el cual se alcanza la concentración plasmática máxima.
k_{el}	Constante de eliminación.
$T_{1/2\ elim}$	Tiempo de vida medio de eliminación plasmática. Tiempo transcurrido desde el ingreso hasta que la concentración plasmática del fármaco se reduce a la mitad

1.2.2 Estudios de bioequivalencia

Los ensayos clínicos de bioequivalencia (BE) son estudios farmacocinéticos (Fase IV) cuyo objetivo es demostrar que dos formulaciones de un mismo principio activo (una formulación de prueba o estudio, E, y otra de referencia, R) presentan un comportamiento farmacocinético tan semejante que se puede asumir, con muy bajo riesgo para el paciente, que presentarán efectos farmacológicos similares, es decir, son terapéuticamente equivalentes y por lo tanto, intercambiables. Esta afirmación se basa en el principio de que a iguales concentraciones plasmáticas de una misma sustancia corresponden iguales efectos farmacodinámicos. Estos estudios, generalmente circunscriptos a una pequeña población de individuos sanos o pacientes, son una alternativa válida para comprobar la eficacia y seguridad de un medicamento genérico

evitando la repetición de todas las fases de ensayos clínicos de eficacia y seguridad requeridas para un medicamento innovador. Por otra parte, tales estudios resultan importantes para evaluar el impacto de cambios que se producen durante el proceso de manufactura, cambios en ingredientes farmacéuticos o de planta de fabricación. En los estudios de BE se comparan las farmacocinéticas de la formulación en estudio (E) con la formulación de referencia (R) (USFDA, 2014b).

La demostración de BE es la condición necesaria, en la mayoría de los casos, para poder afirmar que dos medicamentos con la misma cantidad de un mismo principio activo producen el mismo efecto terapéutico (equivalencia terapéutica) y pueden ser responsables de la aparición de los mismos efectos adversos (seguridad). Estos argumentos son imprescindibles para la autorización de la comercialización de los medicamentos genéricos por parte de las autoridades sanitarias.

La ANMAT estableció la obligación de realizar estudios de bioequivalencia/biodisponibilidad para todas las especialidades medicinales que contengan como principio activo, por lo menos, uno de los antirretrovirales utilizados para el tratamiento de la infección con el VIH, y los que se vayan incorporando, con la formulación que se comercializa en el país (ANMAT, 2001).

Para asegurar la equivalencia entre productos (Formulación en Estudio y Formulación de Referencia) se requieren estudios *in vivo*, existiendo excepciones a ellos, estudios *in vitro*, fundamentalmente relacionadas con la forma farmacéutica y basadas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB).

La equivalencia *in vitro*, se rige en el marco de SCB (Amidon, Lennernäs, Shah, y Crison, 1995), el cual clasifica los IFA de acuerdo a su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal. Para ser exceptuado de un estudio de bioequivalencia *in vivo*, un medicamento oral sólido de liberación inmediata deberá demostrar características de disolución muy rápida o rápida, dependiendo de las propiedades del principio activo en términos de la SCB. Los resultados de perfiles de disolución deberán asimismo demostrar similitud con los correspondientes al producto de referencia. Los excipientes incluidos en la composición de la forma farmacéutica, también deberán ser considerados (ANMAT, 2009).

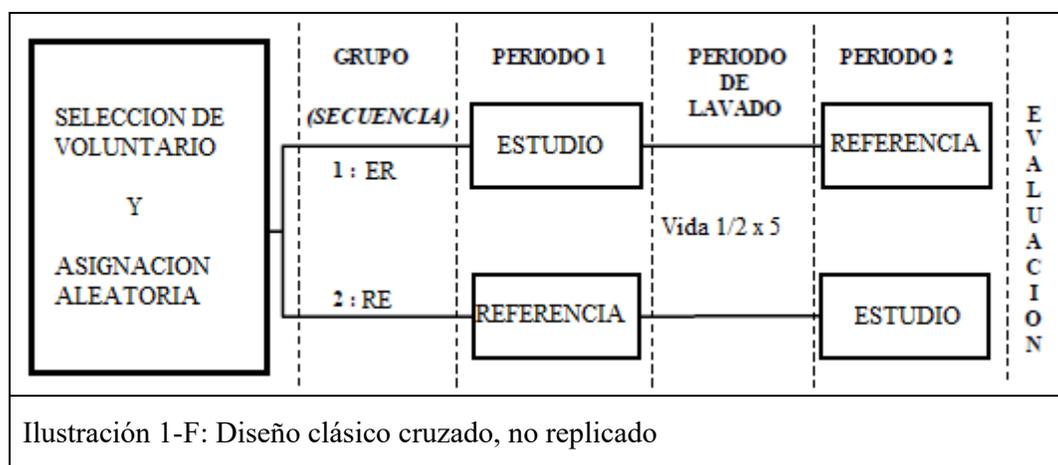
La equivalencia *in vivo* estudia el comportamiento de dos formulaciones a través de tres tipos de ensayos clínicos: 1) estudios farmacocinéticos (estudios de BE); 2) estudios farmacodinámicos; y 3) estudios controlados. Los estudios de BD y BE

investigan la liberación y absorción con parámetros de velocidad y masa, asumiendo que la disposición (distribución, metabolismo y excreción) permanece constante.

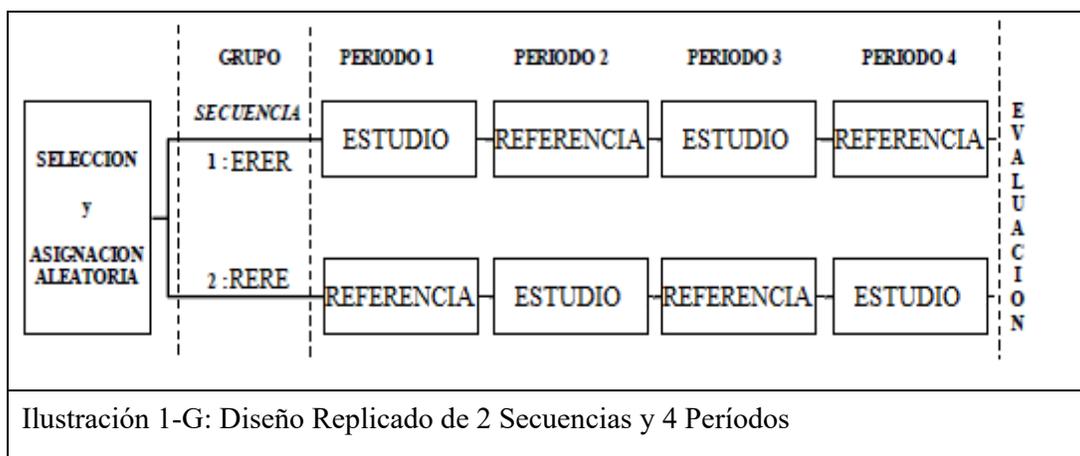
1.2.3 Diseño de estudio de BE

El diseño de todo estudio de BE debe procurar reducir al máximo la variabilidad no dependiente de las formulaciones.

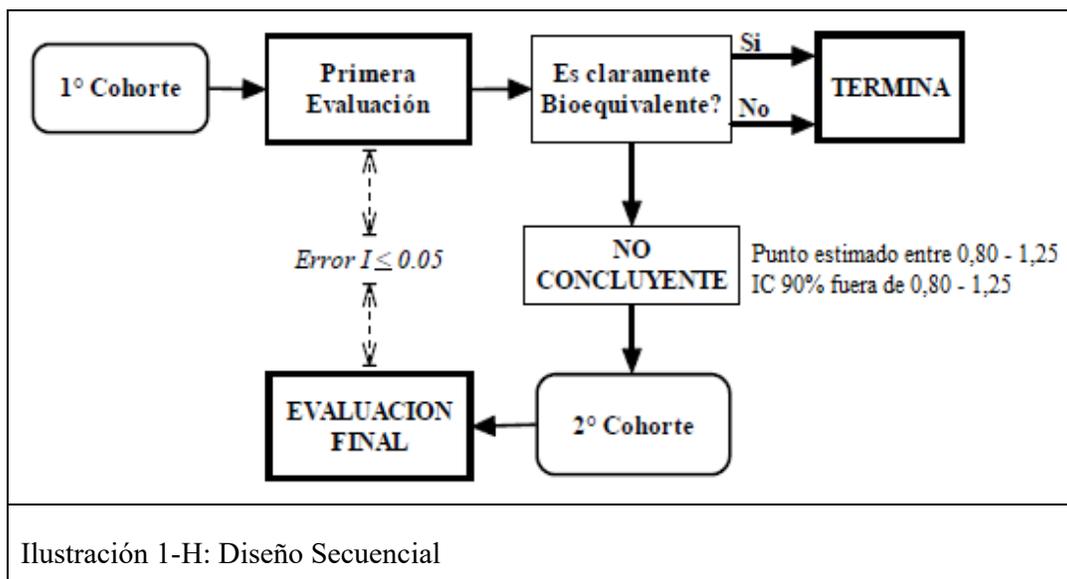
El diseño más habitual en BE entre 2 Formulaciones (E y R) es un estudio de dos secuencias (ER/RE), dos períodos (Período 1/Período 2), dos tratamientos (E/R), cruzado al azar, con una dosis única en cada período, no replicado y balanceado (todos los voluntarios -en igual número en cada secuencia- deben recibir ambos tratamientos, E y R) (Ilustración 1-F).



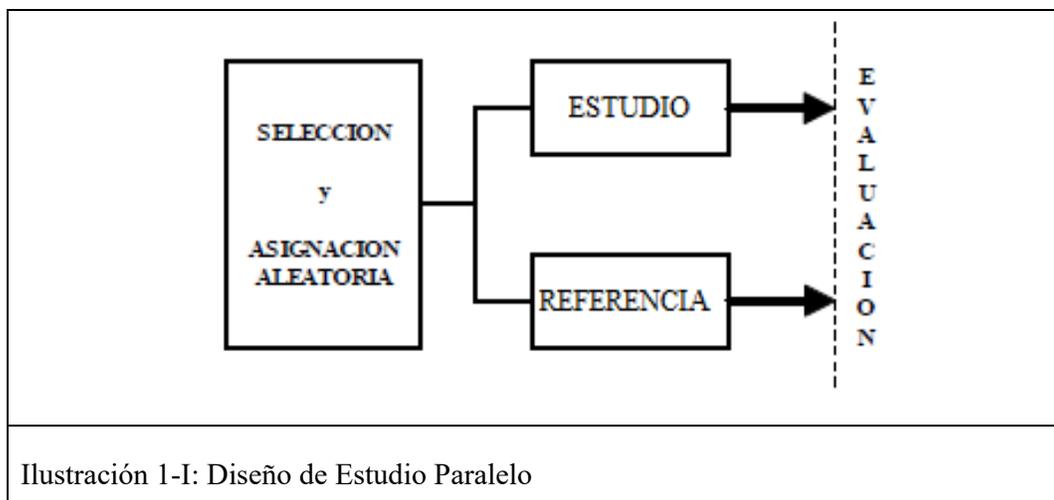
Para las llamadas drogas de “alta variabilidad farmacocinética”, es decir aquellas que poseen un coeficiente de variación intraindividual, igual o mayor al 30%, se acepta que el diseño más adecuado es el replicado de dos secuencias (ERER/RERE) y cuatro períodos (por ejemplo: Secuencia 1: ERER; Secuencia 2: RERE), tal como se presenta en la Ilustración 1-G.



En la Ilustración 1-H e Ilustración 1-I se presentan otros diseños, estadísticamente apropiados, pero deben ser justificados por el patrocinante. En los diseños secuenciales se comienza con un número de voluntarios igual a 24 y el agregado de sujetos para una segunda etapa no debe ser menor a la mitad del número de voluntarios ingresados en el primer tramo del estudio. Una recomendación es que el número de voluntarios para la segunda secuencia se calcule de acuerdo al CV% intraindividual, obtenido con los resultados del primer estudio. En caso que este cálculo arroje un número superior a 12, el patrocinante deberá realizar un estudio replicado que asegure la demostración de BE.



En casos de principios activos con vida media larga (> 24h), si el estudio cruzado resulta problemático por el excesivo período de lavado, puede recurrirse a un diseño de grupos paralelos.



En estos diseños los tiempos de recolección de las muestras deben ser apropiados para permitir el tránsito gastrointestinal completo (entre 2 y 3 días). La recolección de muestras sanguíneas se extenderá como mínimo hasta las 72 horas. Este tipo de estudios, en general, requiere mayor número de voluntarios y en algunas oportunidades, de acuerdo a las características del principio activo (razones de seguridad), deben realizarse en pacientes.

El tiempo transcurrido entre cada dosis de producto E y R, llamado período de lavado, debe ser suficientemente largo como para que en la segunda administración se haya eliminado totalmente el principio activo administrado en el primer período. Este intervalo (período de lavado), deberá ser igual en todos los voluntarios y su duración será de por lo menos 5 veces la vida media terminal (vida media β) del principio activo. En este sentido se tendrá especial cuidado cuando el principio activo o su/s metabolito/s activo/s posean vidas medias largas (24 horas o más). En estos casos puede ser conveniente la utilización de un diseño paralelo. Cuando exista alta variabilidad en la velocidad de eliminación entre los sujetos, el período de lavado se estimará de acuerdo a la velocidad de eliminación más lenta reportada.

En la evaluación pre-dosis, particularmente en el segundo período, no debe haber rastros de la dosis anterior o estos deben ser menores al 5% de la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) obtenida en el primer período. Si un voluntario posee valores pre-dosis por encima del 5% de $C_{m\acute{a}x}$, debe ser excluido del estudio.

1.2.3.1 Voluntarios

El estudio clínico debe contar con la evaluación y aprobación de un comité de ética, acorde a las normas nacionales (ANMAT, 2010) e internacionales vigentes (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996). Obtenida la aprobación del comité de ética, el Investigador Principal (IP) debe contar con el consentimiento informado (CI) firmado por los voluntarios para su participación en el protocolo y comienzo del estudio. Se debe interiorizar al voluntario de los aspectos que hacen a la investigación y todo aquello vinculado al tema que el voluntario solicite saber, en un léxico entendible. Se debe informar al voluntario que su identidad es confidencial, que no pierde sus derechos legales, que es un estudio avalado por la autoridad sanitaria (ANMAT) y que puede retirarse si así lo desea. Los voluntarios deben cumplir los criterios de inclusión y exclusión que determine el protocolo.

El número de voluntarios de un estudio de BE deberá ser calculado teniendo en cuenta la variabilidad intraindividual, la máxima diferencia a ser detectada (20%) y los errores de Tipo I ($\alpha = 0,05$) y Tipo II ($\beta = 0,20$).

El tamaño muestral para una razón E/R = 1, se calculará de acuerdo a la Ecuación 1 (Marzo y Balant, 1995):

$$N > \frac{15,68.CV_{intraindividual}^2}{\Delta^2} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

- ✓ CV Intraindividual: es el coeficiente de variación intraindividual (obtenido de bibliografía o de un estudio piloto previo, a partir del análisis de variancia).
- ✓ $\Delta^2 = 0,20^2 = 0,04$.
- ✓ N: es el número total de voluntarios, $N = n1 + n2$ siendo $n1 = n2$ (n es el número de voluntarios de cada secuencia).

Luego de la administración de la dosis de los fármacos, a cada voluntario se le extrae típicamente unas 15 muestras de sangre a diferentes tiempos en cada uno de los períodos del estudio, de manera de poder describir la farmacocinética. Se procurará que el volumen total de sangre sea lo menor posible, lo cual está estrictamente relacionado a la metodología analítica empleada para cuantificar el analito en la matriz biológica.

1.2.3.2 Criterios estadísticos

La metodología estadística deberá ser claramente expresada en el protocolo y en el informe final; estableciendo los “límites de riesgo” de declarar falsamente la BE entre dos productos. En la metodología se debe incluir la estadística descriptiva y la inferencial.

a) Estadística descriptiva

Se presentan por un lado los datos demográficos de la muestra (edad, sexo, altura, índice de masa corporal, etc.) y por otro lado los parámetros farmacocinéticos ($C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$, K_{el} , $T_{1/2}$, ABC_{0-t} , $ABC_{0-\infty}$) con sus correspondientes parámetros estadísticos (Miller y Miller, 2002) según Tabla 1.3.

Tabla 1.3: Parámetros de estadística descriptiva.

Parámetro estadístico	Expresión matemática
Promedio o media aritmética	$\bar{X} = \frac{\sum_i x_i}{n}$
Media geométrica	$MG = \sqrt[n]{(x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \dots x_n)}$
Desviación estándar	$S = \frac{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}{n-1}$
Coefficiente de variación porcentual	$CV\% = \frac{S}{\bar{X}} 100$

x: valor individual; n: número de determinaciones; S: desviación estándar.

b) Estadística inferencial

1. Análisis de Variancia (ANOVA) de los datos logaritmicamente transformados.

Se debe realizar el ANOVA de los datos log-transformados, de cada uno de los parámetros $C_{\text{máx}}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$, especificando las fuentes de variación (secuencia/arrastre, período, tratamiento), grados de libertad, suma de cuadrados, cuadrados medios, valor del estadístico F y los valores correspondientes de probabilidad.

La Hipótesis Nula a testear con el ANOVA es:

$$H_0: \mu E = \mu R$$

Coefficiente de variación intraindividual porcentual (CV%):

Se debe especificar el coeficiente de variación intraindividual porcentual, obtenido éste mediante la raíz cuadrada de los cuadrados medios residuales del ANOVA, según Ecuación 2:

$$CV\% = (\sqrt{MSE}) 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

donde,

MSE: Cuadrados medios residuales

El CV intraindividual puede calcularse con la Ecuación 3.

$$CV = \sqrt{e^{MSE^2} - 1} \quad \text{Ecuación 3}$$

2. Cálculo del Intervalo de Confianza del 90% para la razón de medias:

Se debe construir el intervalo de confianza del 90% de la razón de medias (con datos logarítmicamente transformados) de los parámetros $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} , $ABC_{0-\infty}$ y luego la aplicación de dos pruebas de hipótesis unilaterales.

3. Resultados de las dos pruebas t unilaterales.

Se deben expresar los resultados de las dos pruebas unilaterales, para cada límite del intervalo de confianza (límite inferior y límite superior), por ejemplo, Prueba de Schuirman. Las hipótesis a testear se presentan en la Tabla 1.4.

Para calcular $T_{m\acute{a}x}$ se debe utilizar solamente estadística descriptiva y en caso de ser necesario establecer BE para $T_{m\acute{a}x}$, se deben emplear métodos no paramétricos.

1.2.3.3 Criterios de aceptación de BE

En la Tabla 1.4 se presentan los criterios de aceptación para los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$. Respecto de ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ si la ventana terapéutica del principio activo es pequeña (menor de 2), el intervalo de confianza puede estrecharse, basándose en fundamentaciones clínicas de eficacia y seguridad. Por otro lado, el intervalo de confianza puede ampliarse (únicamente para $C_{m\acute{a}x}$) basándose en la alta variabilidad intrasujeto del principio activo y fundamentándose en razones clínicas documentadas que esta ampliación no produce modificaciones en la eficacia y seguridad del medicamento.

El análisis estadístico de $T_{m\acute{a}x}$, se realiza si existe evidencia clínica documentada de rápido comienzo de acción del principio activo o información sobre efectos adversos relacionados. Dadas las características de $T_{m\acute{a}x}$ se utiliza un intervalo de confianza no paramétrico, que debe encontrarse dentro de 0,80-1,25.

Tabla 1.4: Criterios de aceptación de estadística inferencial en estudios de BE.

Parámetro	Hipótesis	Criterio de aceptación
In $C_{m\acute{a}x}$ %	Condición de bioequivalencia: H_{0a}): $LI < 0,80$ y H_{0b}): $LS > 1,25$	El Intervalo de Confianza del 90% de estas razones debe encontrarse comprendido entre 0,80 y 1,25
In ABC_{0-t} %		
In $ABC_{0-\infty}$ %	Condición de BE: H_{1a}): $LI > 0,80$ y H_{1b}): $LS < 1,25$	

Cuando se realiza un estudio de bioequivalencia, las diferencias que se encuentran entre las dos formulaciones se pueden deber a distintos factores. Estos pueden ser el orden en el que se administran las formulaciones (efecto secuencia), el día en que se realiza la administración de cada una de ellas o el periodo de administración (efecto periodo), el posible efecto del fármaco administrado en el primer periodo sobre el fármaco administrado en el segundo periodo (efecto de arrastre o “carry-over”), a la formulación de la que se trate (efecto tratamiento o formulación), al diferente comportamiento del fármaco en los individuos a los que se administra (variabilidad interindividual) y a otro factor que, a diferencia de los anteriores, no está controlado mediante los requisitos o peculiaridades del diseño del estudio y que corresponde a un conjunto de factores aleatorios o variabilidad residual. Es fundamental antes de realizar el análisis de bioequivalencia comprobar que no existe efecto periodo, secuencia, de arrastre ni de tratamiento. El hallazgo de un efecto periodo sugiere que existe algún tipo de problema en la realización del estudio: diferencias en el manejo, análisis y almacenamiento de las muestras biológicas (por lo que todas las muestras del mismo individuo de los dos períodos deberían analizarse simultáneamente), diferencias climáticas, dietéticas, actividad física, etc. La existencia de efecto de arrastre indica un mal diseño del ensayo (periodo de lavado insuficiente) y suele invalidar los resultados del estudio para extraer conclusiones sobre la bioequivalencia

El modelo estadístico para el análisis de los datos de las variables farmacocinéticas debe considerar de manera aditiva las siguientes fuentes de variación o factores de variación principalmente:

- Secuencia (Se) de administración.
- Periodo (P) de administración.
- Formulación (algunas veces denominado Tratamiento).

Las hipótesis a probar son:

- Secuencia: $H_0: SeR = SeE$ versus $H_1: SeR \neq SeE$.
- Periodo: $H_0: PR = PE$ versus $H_1: PR \neq PE$.
- Formulación: $H_0: FR = FE$ versus $H_1: FR \neq FE$.

Criterio para determinar los efectos de secuencia, periodo y tratamiento: Se determina que no existe efecto significativo, si el valor de la probabilidad obtenido es mayor a 0,05 y la potencia de la prueba es mayor a 0,8.

1.3 Metodologías bionalíticas en estudios farmacocinéticos

1.3.1 Cromatografía

En general, los métodos para el análisis químico son, en el mejor de los casos, selectivos y solamente algunos son verdaderamente específicos. En consecuencia, la separación del analito de las posibles interferencias es a menudo una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos. Hasta mediados del siglo XX, las separaciones analíticas se llevaban a cabo en su mayor parte por métodos clásicos de preparación de muestras como precipitación, destilación y extracción. Sin embargo, las separaciones analíticas se realizan, en la mayoría de los casos, por cromatografía y electroforesis, especialmente en el caso de mezclas complejas y multicomponentes. La cromatografía es un poderoso “método de separación” que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Las aplicaciones de la cromatografía han aumentado en gran manera en los últimos cincuenta años, debido no sólo al desarrollo de nuevos y diversos tipos de métodos cromatográficos, sino también a las necesidades crecientes, por parte de los científicos, de mejores métodos para la caracterización de mezclas complejas. El impacto de esos métodos en la ciencia se confirmó al otorgarse el Premio Nobel de 1952 a A.J.P. Martin y R.L.M. Synge por sus descubrimientos en este campo. Más impresionante es, quizás, la lista de doce Premios Nobel concedidos entre 1937 y 1972, los cuales se basaron en trabajos en los que la cromatografía tenía un papel vital, a día de hoy, indudablemente, esta lista ha aumentado (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles, una fase estacionaria y otra móvil. La muestra se introduce en la fase móvil y es transportada a lo largo de la columna que contiene distribuida una fase estacionaria. Las especies químicas (o analitos) de la muestra experimentan interacciones repetidas entre ambas fases, por lo que dichas especies se reparten entre las fases inmiscibles a lo largo de la corrida cromatográfica. Cuando ambas fases se escogen en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil por diferencia de afinidad con la fase estacionaria. Así, los analitos con mayor afinidad por la fase estacionaria serán más retenidos. Al final del proceso los componentes separados eluyen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. Como resultado de este proceso de partición los analitos que tuvieron mayor afinidad con la fase estacionaria reportarán mayores tiempos de retención (t_R). El reparto entre las fases

aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra y las fases (móvil y estacionaria) involucradas. La columna de separación puede considerarse como el corazón del cromatógrafo, proporcionando versatilidad en los tipos de análisis que pueden realizarse. Esta característica, debida a la amplia gama de selección de materiales para la fase estacionaria, permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físicas y químicas. En un sentido amplio, la distribución de un analito entre dos fases es el resultado del balance de fuerzas entre las moléculas del analito y las moléculas de cada fase. Refleja la atracción o repulsión relativas que presentan las moléculas o iones de las fases competidoras por el analito y entre sí. Estas fuerzas pueden ser de naturaleza polar, proviniendo de momentos dipolares permanentes o inducidos, o pueden deberse a fuerzas de dispersión del tipo London. En cromatografía de intercambio iónico, las fuerzas en las moléculas del analito son sustancialmente de naturaleza iónica; pero incluyen también fuerzas polares y no polares (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

1.3.1.1 Clasificación de los métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos. El primero de ellos se basa en la forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto. En la cromatografía en columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión. En la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad. Sin embargo, es importante señalar aquí que los equilibrios en los que se basan los dos tipos de cromatografía son idénticos, y que la teoría desarrollada para la cromatografía en columna se adapta también fácilmente a la cromatografía en plano. Una clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los analitos entre las fases. La Tabla 1.5 muestra la relación de las tres clases generales de cromatografía: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos.

Como su nombre indica, las fases móviles en las tres técnicas son, respectivamente, líquidos, gases y fluidos supercríticos. Como se muestra en la segunda columna, las dos primeras clases generales incluyen varios métodos cromatográficos. Solamente la cromatografía de líquidos es la que puede llevarse a cabo en columnas o

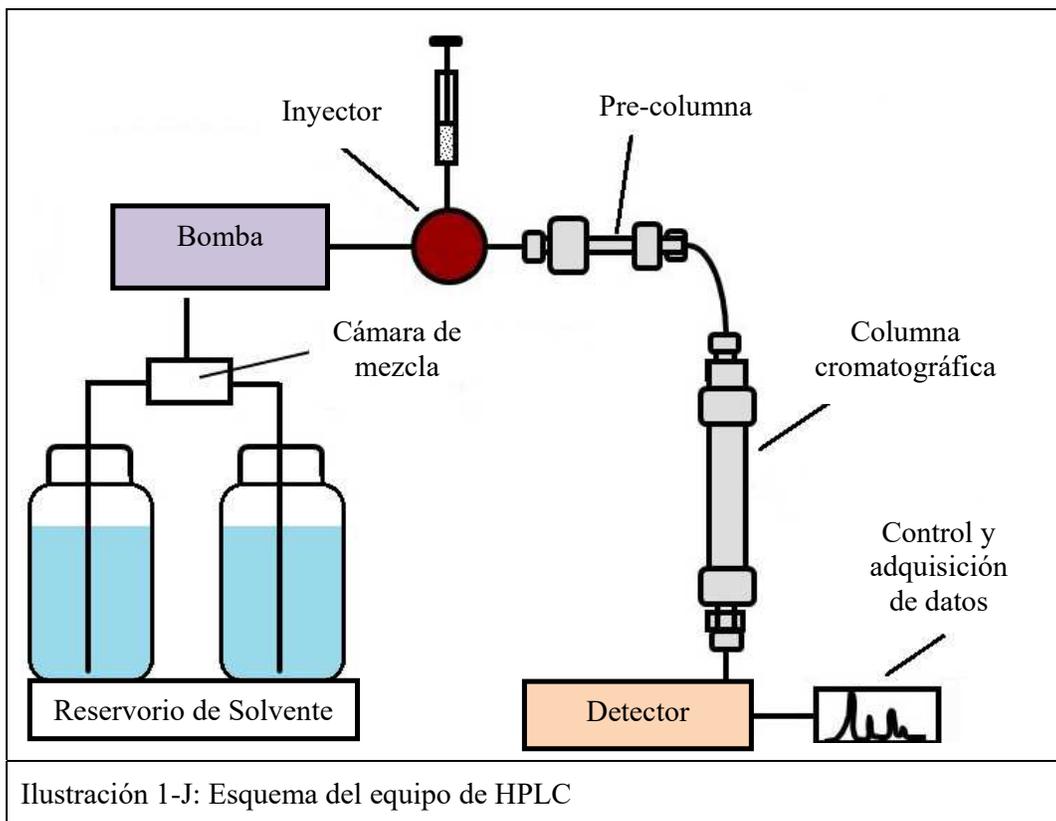
sobre superficies planas; por otra parte, tanto la cromatografía de gases como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna, de tal manera que las paredes de la columna contienen la fase móvil (Skoog y col., 2001).

Tabla 1.5: Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.

Clasificación general	Método Específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC) (fase móvil: líquida)	Líquido-Líquido, o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscible
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases (GC) (fase móvil: gas)	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

1.3.1.2 Sistema cromatográfico

En la Ilustración 1-J se presenta un esquema típico de un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) el cual está constituido principalmente por un reservorio de solvente, una o más bombas, inyector automático o puerto de inyección, columna analítica la cual idealmente debe estar termostatazada, detector y un sistema de control y adquisición de datos (LoBrutto y Kazakevich, 2007).



- **Reservorio de solventes:** Almacena la cantidad suficiente de solventes para la operación continua del sistema. Podría ser equipado con un sistema de desgasificación en línea y filtros especiales para aislar el solvente de la influencia del medio ambiente.
- **Bomba:** Proporciona el flujo constante y continuo de la fase móvil a través del sistema; la mayoría de las bombas modernas permiten la mezcla controlada de solventes de diferentes depósitos.
- **Inyector:** Permite la introducción (inyección) de un volumen discreto de muestra sin interrumpir el flujo de fase móvil antes de entrar a la columna, permitiendo mantener la presión del sistema.

- **Pre-columna:** Se instalan entre el inyector y la entrada de la columna con el propósito de atrapar partículas sólidas y aumentar la vida útil de la columna analítica.
- **Columna:** Es el corazón del sistema y separa los analitos en la mezcla. La columna es el lugar donde la fase móvil está en contacto con la fase estacionaria, formando una interfaz con enorme superficie. La mayor parte del desarrollo de la cromatografía en los últimos años se centró en el diseño de nuevos sistemas para mejorar este contacto interfacial. Generalmente, la variación de temperatura dentro de la columna debe mantenerse dentro de $\pm 0,2$ °C, esto es especialmente importante en el análisis cuantitativo, ya que los cambios en la temperatura pueden afectar la medición de la altura o área del pico cromatográfico.
- **Detector:** Es un dispositivo para el registro continuo de las propiedades físicas o químicas del efluente de la columna. Se pueden acoplar detectores universales y/o específicos o la combinación de ambos según la prestación que se pretende de la cromatografía.
- **Sistema de control y adquisición de datos:** Sistema computarizado que controla todos los parámetros del instrumento de HPLC (composición de fase móvil, temperatura, secuencia de inyección, etc.), adquiere los datos del detector y monitorea el estado del sistema.

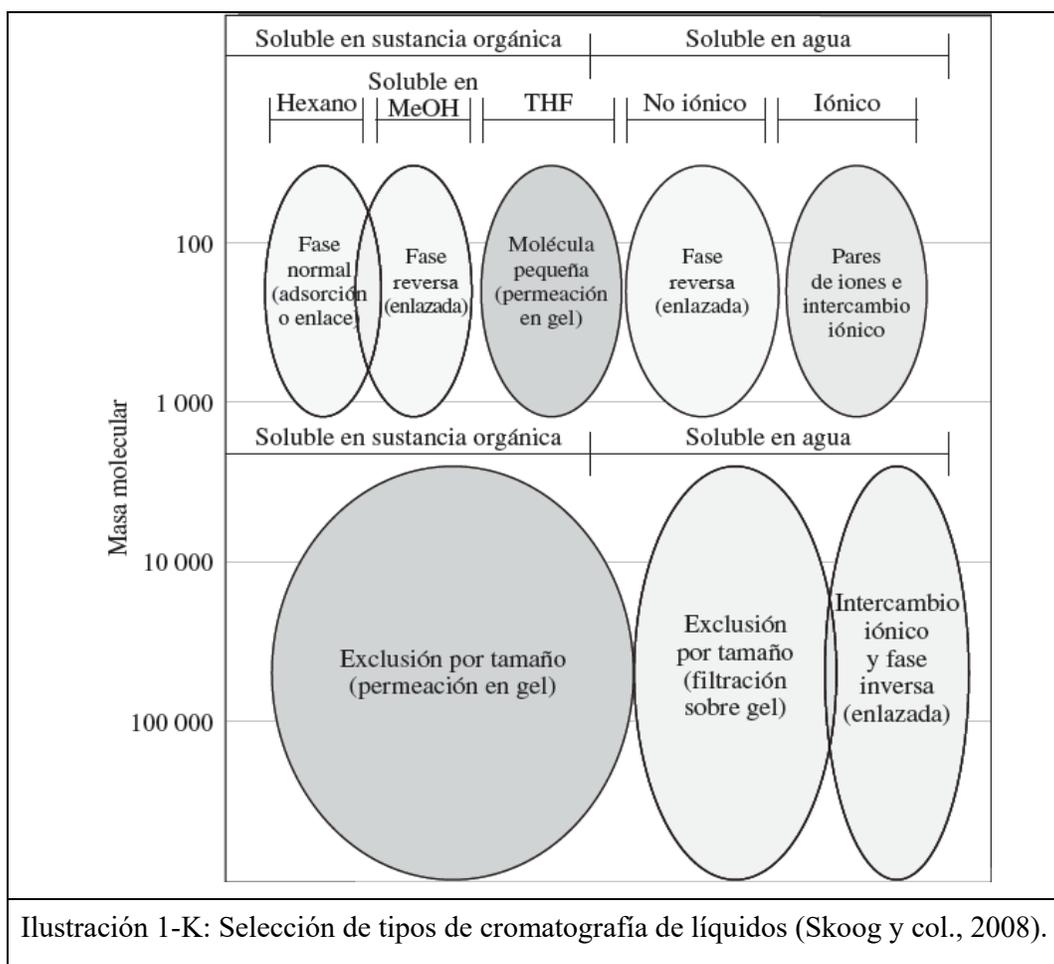
1.3.1.3 Tipos de cromatografías líquidas

Los métodos de reparto se aplican a las especies poco polares no iónicas. Además, este procedimiento se utiliza muchas veces para la separación de los integrantes de una serie homóloga. La cromatografía de adsorción se elige con frecuencia para separar especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos como, por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos de los alcoholes alifáticos (LoBrutto y Kazakevich, 2007).

En la Tabla 1.6 se especifican las características dominantes de los tipos de cromatografías líquidas y la Ilustración 1-K pone de manifiesto que tienden a ser complementarios por lo que a sus campos de aplicación se refiere (Skoog y col., 2001). Así, para analitos con masas moleculares superiores a 10.000 dalton, a menudo se utiliza la cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos con cromatografía de reparto en fase reversa. Para especies iónicas de baja masa molecular, se utiliza con frecuencia la cromatografía de intercambio iónico.

Tabla 1.6: Características dominantes de los tipos de cromatografías líquidas.

Tipo de cromatografía	Fase estacionaria	Fase móvil	Analito	Mecanismo
Fase normal	Polar	Apolar o poco Polar	Polar	Reparto
Fase reversa	Apolar	Polar	Apolar o poco polar	Reparto, adsorción
Intercambio iónico	Iónica	Contraiónico de la fase estacionaria	Contraiones de la fase estacionaria y moléculas polares	Atracción electrostática
Exclusión por tamaño	Polimérica	Inerte, solvatando al analito y no interacciona con fase estacionaria	No interacciona químicamente con fase estacionaria	Exclusión molecular



En la presente tesis y en función de las características de los analitos la modalidad cromatográfica utilizada fue fase reversa.

1.3.1.3.1 Cromatografía en fase reversa

La cromatografía líquida de fase reversa fue introducida por Howard y Martin en 1950. Hasta ese momento, la cromatografía de líquidos se utilizaba básicamente para separar compuestos poco polares, siendo la fase estacionaria de un carácter altamente polar y la fase móvil poco polar. Estos científicos revirtieron la polaridad de las fases con el objetivo de separar ácidos grasos de tal manera que la superficie de la fase estacionaria fuera hidrófoba y la fase móvil polar, cuando se emplean soluciones principalmente acuosas. Se estima que aproximadamente el 80-90% de todas las separaciones analíticas se realizan en modo fase reversa (RP por su sigla en inglés) debido a la introducción de una gran variedad de fases estacionarias. Prácticamente todas las separaciones de fase reversa se llevan a cabo en fases estacionarias con superficies hidrófobas químicamente modificadas. Las variaciones menores en la química superficial y en la geometría pueden conducir a diferencias perceptibles en interacciones y, como resultado, generar diferencias en la selectividad cromatográfica. La fase estacionaria para cromatografía de fase reversa consiste en una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido químicamente compuestos hidrofóbicos. Los soportes para casi todos los rellenos se preparan con sílica rígida, formada por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros principalmente entre 1,9 y 5 μm . La fase móvil (eluyente) es la principal "herramienta" para el control de la retención de analito en RP. Las variaciones de la composición del eluyente, el tipo de modificador orgánico, el pH y la composición de *buffer* proporcionan a la cromatografía un valioso conjunto de variables para el desarrollo exitoso de un método de separación. El pH en fase móvil afecta a la ionización del analito y, por lo tanto, su aparente hidrofobicidad y afinidad. La mayoría de los analitos farmacéuticos, IFA (ingrediente farmacéutico activo), productos intermedios en proceso, muestras de reacción, sustancias medicamentosas, materias primas, fármacos y otros tipos de muestras generadas durante el ciclo de vida del fármaco, son ionizables y su retención se ve afectada por el pH de la fase móvil.

La base para la retención del analito en cromatografía de fase reversa son las interacciones competitivas del analito y los componentes de la fase móvil con la fase estacionaria. Cuanto más fuerte son las interacciones del analito con dicha fase, mayor es su retención.

La introducción de fases estacionarias químicamente modificadas ha tenido un impacto notable en el campo de la cromatografía líquida. El desarrollo exitoso y la mejora en la tecnología de fabricación de capas adhesivas reproducibles han revolucionado muchas técnicas cromatográficas. Las fases estacionarias de sílice porosa han sido modificadas con ligandos de diversidad química y de tamaño. La composición y la estructura de la capa orgánica unida se varían cambiando el tamaño del modificador, el área superficial específica del adsorbente y la densidad de unión. La unión química de ligandos orgánicos con alta densidad de unión en la superficie interna de los poros de sílice altera la geometría adsorbente. El efecto de la modificación superficial en los parámetros geométricos adsorbentes (área superficial, volumen de poro, tamaño de poro) ha sido investigado en diferentes geles de sílice demostrando que una disminución en el diámetro medio y volumen de los poros están asociados con el volumen molecular de los ligandos unidos y la densidad de unión.

Los materiales de empaque con base de sílice predominan en las aplicaciones para separaciones de RP en la industria farmacéutica. La superficie hidrófoba de estos empacados se realiza típicamente por unión covalente de organosilanos sobre la superficie de sílice. Esta modificación implica la reacción de alquildimetilclorosilanos monofuncionales con los grupos silanol superficiales. El octadecilsilano fue la primera fase enlazada a base de sílice disponible comercialmente y sigue siendo el más utilizado. También se usan a menudo ligandos de tipo alquilo de diferente número de átomos de carbono (C_1 , C_4 , C_8 , C_{12}) así como fases con funcionalidad fenilo; también se han introducido fases polares incrustadas en el extremo polar. Estas fases polares proporcionan una vía adicional para la modificación potencial de la selectividad cromatográfica, y algunas ofrecen una mejora en la retención de analitos polares. Estas fases pueden usarse con fases móviles altamente acuosas, sin pérdida de retención del analito que a veces se podría observar para fases más hidrófobas.

Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque, las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del solvente; para ello se puede substituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente. Las variaciones de la composición del eluyente, el tipo de modificador orgánico, el pH y la concentración de solución

reguladora proporcionan al cromatógrafo un valioso conjunto de variables para el desarrollo exitoso de un método de separación (LoBrutto y Kazakevich, 2007).

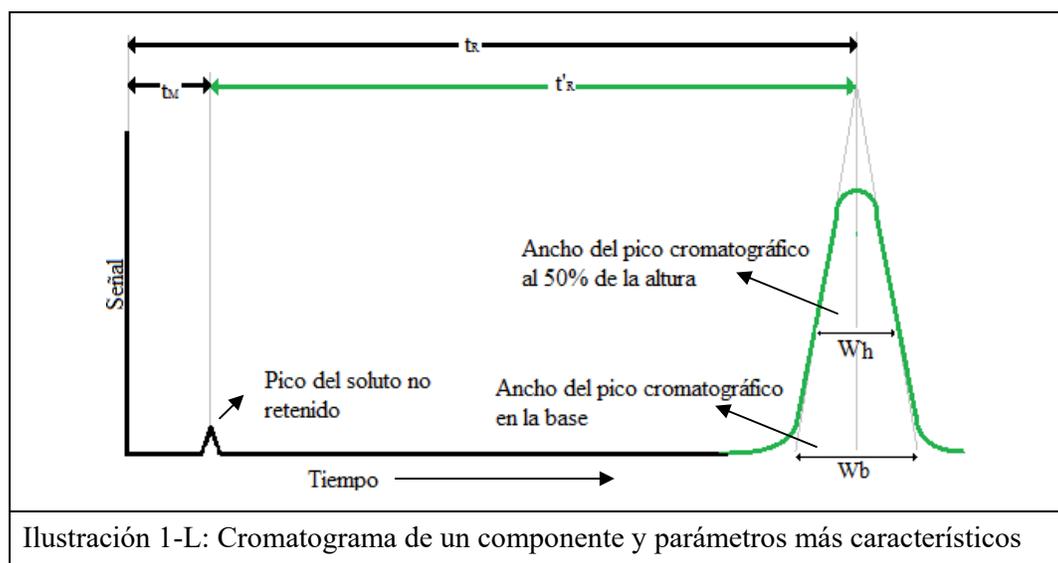
1.3.1.4 Comportamiento cromatográfico de los solutos

El cromatograma es la curva de elución que se obtiene en una cromatografía y representa la señal recogida por el detector en respuesta a la concentración de analito en función del tiempo o del volumen de fase móvil añadido. A partir de la Ilustración 1-L e Ilustración 1-M se obtienen los parámetros cromatográficos básicos los cuales se resumen en la Tabla 1.7 (Quattrocchi y col., 1992).

1.3.1.4.1 Retención y factor de capacidad

Cuando se introduce un compuesto en la corriente de la fase móvil de un sistema cromatográfico, de no existir interacción entre éste y la fase estacionaria, la banda que forma se desplazaría a la misma velocidad que la fase móvil y emergería de la fase estacionaria cuando el volumen total de la fase móvil utilizado fuese igual al volumen vacío o intersticial del lecho estacionario (volumen muerto).

La “retención” es la capacidad real de la fase estacionaria para retardar la salida de un componente. El tiempo muerto, t_M , es el tiempo que tarda en salir un componente que no se retiene (o el propio eluyente). El tiempo de retención (t_R), es el tiempo medio que tarda en salir un determinado componente. En la Ilustración 1-L se muestran los parámetros de retención para el caso de una única banda cromatográfica. Se observa que el t_R de la banda puede dividirse en dos partes: i) el tiempo muerto, t_M ; ii) y el tiempo transcurrido a partir de este momento hasta la aparición del máximo de la banda, t'_R .



A partir de la definición de tiempo muerto se induce que el segundo, t'_R , es el tiempo real que la fase estacionaria ha retrasado el avance del compuesto y se conoce con el nombre de tiempo de retención corregido. El factor de capacidad (k'), expresa la retención de un compuesto por la fase estacionaria independientemente del caudal de la fase móvil y se calcula según la Ecuación 4:

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{Ecuación 4}$$

En la práctica, los compuestos de interés deben presentar valores de k' comprendidos entre 1 y 15 con el fin de no alargar excesivamente los tiempos de separación, siendo 5 un valor óptimo.

1.3.1.4.2 Eficacia

Para hacer máxima la operatividad de una separación cromatográfica debe evitarse en lo posible el ensanchamiento de las bandas. En efecto, cuanto más anchas sean las bandas, menor número de ellas se podrán resolver en un espacio de tiempo dado. Los anchos de las bandas cromatográficas dependen de las características de la columna (tamaño de las partículas de la fase estacionaria, homogeneidad de ésta, etc.), así como de otros factores como, por ejemplo, la velocidad de la fase móvil. En consecuencia, para expresar la calidad de un pico, se utiliza un parámetro comparativo relativo como es el cociente entre t_R y el ancho de la banda cromatográfica (S). En la práctica, se define la eficacia de una columna como el cuadrado del cociente entre el t_R y S y se expresa como el número de platos teóricos (n) según Ecuación 5:

$$n = \left[\frac{t_R}{S} \right]^2 \quad \text{Ecuación 5}$$

Así, el número de platos teóricos de una columna puede calcularse utilizando el ancho de uno de sus picos, normalmente el último que pueda medirse directamente sobre el cromatograma utilizando la Ecuación 6 y Ecuación 7:

$$n = 16 \left[\frac{t_R}{W_b} \right]^2 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$n = 5.545 \left[\frac{t_R}{W_h} \right]^2 \quad \text{Ecuación 7}$$

El número de platos de una columna cromatográfica depende lógicamente de su longitud, por lo que para comparar la eficacia de columnas con diferente longitud se introduce otro término, denominado altura equivalente de un plato teórico (h), que relaciona la eficacia de una columna con su longitud y que se define como el cociente entre la longitud de la columna (L) y su número de platos teóricos (n) según Ecuación 8:

$$h = \frac{L}{n} \quad \text{Ecuación 8}$$

Es de destacar que, al considerar la eficacia, solamente se han tenido en cuenta los efectos propios de la columna, aunque existen otros parámetros del sistema (anchura de banda inicial, velocidad de la fase móvil, etc.) que contribuyen al ensanchamiento de las bandas cromatográficas.

1.3.1.4.3 Separación y resolución

El objeto de la cromatografía es separar mezclas de varios componentes y es de suma importancia considerar la separación entre ellos. Debe recordarse siempre que, independientemente del número de componentes que pueda tener la mezcla, el problema de separación de todos ellos queda siempre reducido al de las dos bandas adyacentes más difíciles de separar. La separación entre dos bandas cromatográficas (Ilustración 1-M) puede estudiarse en función de dos parámetros:

- ✓ La retención relativa (α), definida en la Ecuación 9 como el cociente entre los tiempos de retención corregidos de las dos bandas.

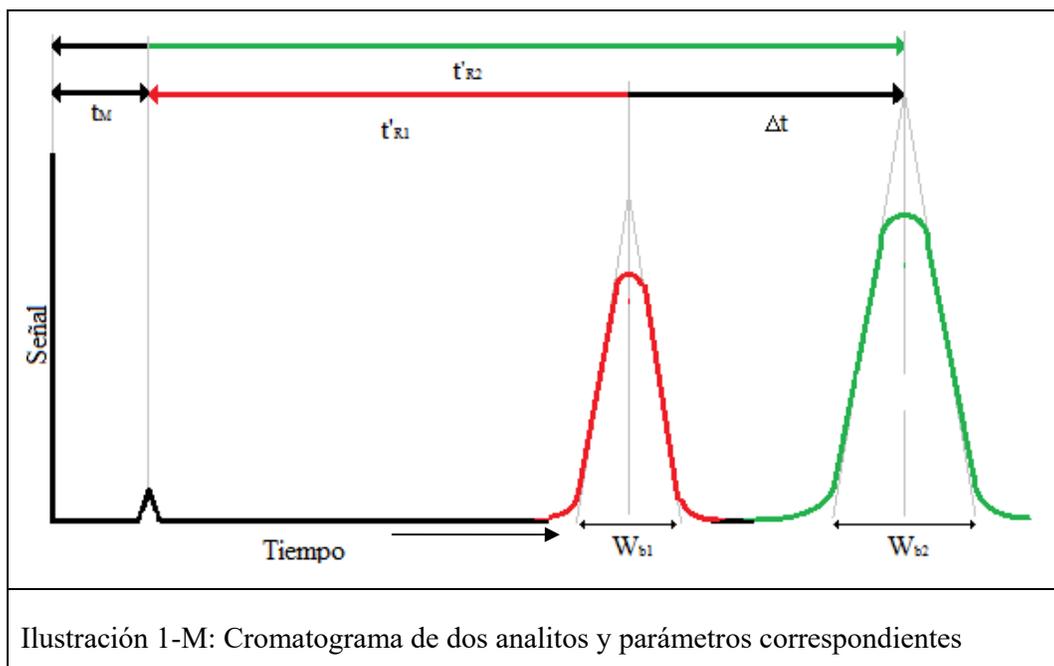
$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad \text{Ecuación 9}$$

- ✓ La resolución (R_s), definida en la Ecuación 10 como el cociente de la distancia entre los centros de las dos bandas (Δt) y el valor medio de la anchura de las mismas.

$$R_s = \frac{2\Delta t}{W_{b1} + W_{b2}} \quad \text{Ecuación 10}$$

En consecuencia, una separación total de dos bandas requerirá valores de α y R_s lo más elevados posible. Es de tener en cuenta que mientras que un valor elevado de R_s puede conseguirse aumentando la eficacia de la columna (mayor longitud de columna, menores dispersiones de banda, etc.), el valor de la retención relativa, es constante para

cada sistema cromatográfico y solamente podrá variar alterando la fase estacionaria o la fase móvil; en otras palabras, cambiando el sistema cromatográfico.



1.3.1.4.4 Dispersión de bandas

Cuando se inyecta una mezcla de solutos al sistema cromatográfico, por ejemplo 20 μL de solución, la mezcla se separa y puede eventualmente recolectarse en forma fraccionada, de modo de obtener los compuestos puros. Si en lugar de tiempos tomados frecuentemente por comodidad consideramos la retención en función del volumen de elución, para recolectar un pico debe fraccionarse el total del volumen entre el comienzo y la finalización de su señal. Ya sea que las fracciones se recolecten o no, al salir de la columna cada componente estará diluido, no en los 20 μL originales de solvente sino en un volumen mayor, debido a que sufre difusión a medida que avanza a través del sistema cromatográfico. Este fenómeno puede apreciarse en los cromatogramas, donde se ve claramente que los picos (o bandas) menos retenidos tienen menor ancho que los más retenidos. Este ensanchamiento de banda es normal y como depende de la eficiencia (n) de la columna, los procesos que la gobiernan se conocen como procesos de ensanchamiento de banda intracolumnares.

La Ecuación 6 puede reordenarse para obtener la Ecuación 11 y considerando que el número de platos teóricos es aproximadamente constante para todos los solutos, se deduce que, a mayor tiempo de retención, corresponderá mayor ancho de pico.

$$w = t_R \frac{4}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 11

Existen sin embargo otros procesos que provocan el ensanchamiento de los picos y son producidos por factores instrumentales y experimentales. Estos se conocen como procesos de ensanchamiento de banda extra columna y si bien son inevitables, su conocimiento permite controlarlos y eventualmente minimizarlos.

Tabla 1.7: Parámetros básicos en HPLC.

Parámetro cromatográfico	Fórmula
Factor de capacidad	$k' = \frac{t'_{R1}}{t_M} = \frac{t_{R1} - t_M}{t_M}$
Eficacia	$n = 16 \left[\frac{t_{R1}}{W_{b1}} \right]^2$
Altura equivalente de un plato teórico	$h = \frac{L}{n}$
Retención relativa	$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$
Resolución	$R_s = \frac{2\Delta t_{2-1}}{W_{b1} + W_{b2}}$
Dispersión de bandas	$w = t_R \frac{4}{\sqrt{n}}$

1.3.1.5 Sistemas de detección para cromatografía líquida

La elección del detector es a menudo crucial para el éxito de un método particular de HPLC. Entre los más frecuentemente usados, se pueden mencionar detectores UV/Vis, electroquímicos, fluorescencia, conductividad e índice de refracción; cada uno tiene ventajas y desventajas particulares.

Los detectores pueden clasificarse de varias maneras: (Ardrey, 2003):

1) Detectores de propiedades de analito o solvente

Esta clasificación se refiere a si el detector monitorea una propiedad del analito, por ejemplo, el detector UV, o un cambio en alguna propiedad del solvente causada por la presencia de un analito, como en el caso del detector de índice de refracción.

2) Detectores selectivos o generales (universales)

Esta clasificación se refiere a si el detector responde a una característica específica del analito de interés o si responderá a un gran número de analitos,

independientemente de sus propiedades estructurales. En términos de la clasificación anterior, puede considerarse que los detectores de analito también suelen ser detectores selectivos, mientras que los detectores de solventes son detectores generales.

La metodología de detector de HPLC más utilizada es, posiblemente, la absorción UV y tiene capacidades como detector específico o general, dependiendo de la manera en que se use.

Si se conoce la longitud de onda de absorción máxima del analito (λ_{max}), se puede monitorear y el detector puede considerarse selectivo para ese analito o analitos. Dado que las absorciones UV son, sin embargo, generalmente amplias, esta forma de detección rara vez es suficientemente selectiva. Si está disponible un detector de arreglo de diodos, se puede relevar más de una longitud de onda simultáneamente y se mide la proporción de absorbancias. La relación medida entre una muestra 'desconocido' y una muestra de referencia puede proporcionar una idea cualitativa y otorgar cierto grado de confianza en que es el analito de interés el que se está midiendo, aunque no certeza absoluta.

Muchas moléculas orgánicas absorben radiación UV hasta cierto punto a 254 nm y si se usa esta longitud de onda puede considerarse un sistema de detección general. Debe recordarse, sin embargo, que no todos los compuestos absorben la radiación UV.

Un detector general ampliamente utilizado es el detector de índice de refracción que supervisa los cambios en el índice de refracción de la fase móvil cuando un analito eluye de la columna. Si se usa elución de gradiente, el índice de refracción de la fase móvil también cambia a medida que varía su composición, dando así una línea de base de detector que varía continuamente. La determinación de la posición y la intensidad de una señal analítica de baja intensidad en una línea de base variable es menos precisa y menos exacta que la misma medida en una línea de base constante con señal de fondo despreciable.

Por lo general se reconoce que los detectores universales son menos sensibles que los detectores específicos, tienen un rango dinámico inferior y no dan los mejores resultados cuando se usa elución de gradiente.

Al igual que el detector de UV, el espectrómetro de masas puede emplearse como detector general, cuando se adquieren espectros de masas de escaneo completo (*full scan*) o como detector específico, cuando se están usando monitoreo de iones seleccionados o espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

3) Detectores sensibles a la masa o a la concentración

La clasificación final se refiere a si la intensidad de la respuesta del detector es proporcional a la concentración del analito o la cantidad absoluta de analito que la alcanza. Esta clasificación es particularmente importante para aplicaciones cuantitativas. Si el caudal de fase móvil se incrementa, la concentración de analito que llega al detector permanece igual, pero la cantidad de analito aumenta.

En estas circunstancias, la intensidad de la señal procedente de un detector sensible a la concentración permanecerá constante, aunque la anchura del pico disminuirá, es decir, el área de la respuesta disminuirá. Un cambio en el caudal también reducirá la anchura de la respuesta de un detector sensible a la masa, mientras que, en un detector sensible a la concentración, la intensidad de la señal aumentará a medida que la cantidad absoluta de analito que llega al detector ha aumentado. Dado que la respuesta global aumenta, esto puede usarse para mejorar la calidad de la señal obtenida.

Bajo ciertas condiciones experimentales, el espectrómetro de masas funciona como un detector sensible a la masa, mientras que, en otros, con LC-MS utilizando ionización por electronebulización como buen ejemplo, puede funcionar como detector sensible a la concentración.

Una ventaja del espectrómetro de masas como detector es que puede permitir la diferenciación de compuestos con características de retención similares o puede permitir la identificación y/o determinación cuantitativa de componentes que sólo se resuelven parcialmente cromatográficamente o incluso aquellos que están totalmente sin resolver. Esto puede reducir el tiempo requerido para el desarrollo del método analítico.

1.3.2 Espectrometría de masa

De todas las herramientas analíticas de que dispone el científico, la espectrometría de masas es quizás la de mayor aplicación, en el sentido de que esta técnica es capaz de proporcionar información acerca: (1) de la composición elemental de las muestras, (2) de la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas, (3) de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas, (4) de la estructura y composición de superficies sólidas y (5) de las relaciones isotópicas de átomos en las muestras (Skoog y col., 2001).

La primera aplicación general de la espectrometría de masas molecular en análisis químico de rutina se produjo a principio de los años cuarenta, cuando estas técnicas comenzaron a ser aplicadas en la industria del petróleo, para el análisis

cuantitativo en mezclas de hidrocarburos, producidas por fraccionamientos catalíticos. Anteriormente, el análisis de las mezclas de este tipo, que con frecuencia poseían hasta nueve componentes hidrocarbonados, se llevaba a cabo por destilación fraccionada y posteriores medidas del índice de refracción de los componentes separados. Para completar el análisis se requería un tiempo de operación de 200 horas o más. Se descubrió que una información similar se podía obtener en tan sólo algunas horas o incluso menos, con un espectrómetro de masas. Esta eficaz mejora, supuso la aparición y rápido perfeccionamiento de los espectrómetros de masas. A comienzo de los años cincuenta, estos instrumentos comerciales empezaron a ser utilizados por los químicos para la identificación y elucidación estructural de una amplia variedad de compuestos orgánicos. Este uso de la espectrometría de masas junto con la invención de la resonancia magnética nuclear y el desarrollo de la espectrometría en el infrarrojo, revolucionaron el campo de trabajo de los químicos orgánicos respecto a la identificación y determinación de la estructura de moléculas. En la década de los ochenta, las aplicaciones de esta técnica experimentaron grandes cambios como consecuencia del desarrollo de los métodos de producción de iones de moléculas no volátiles o termolábiles, muchas de ellas estudiadas con frecuencia por bioquímicos y biólogos. Desde 1990, ha habido un enorme crecimiento en el área biológica como consecuencia de los nuevos métodos de ionización. Actualmente esta técnica está siendo aplicada a la determinación de estructuras de polipéptidos, proteínas y otros biopolímeros de elevado peso molecular (Skoog y col., 2001).

Los espectrómetros de masas de cuadrupolo o las trampas de iones cuadrupolares son, hoy en día, los espectrómetros de masas más utilizados. Las bases físicas fueron descritas en la década de 1950 por Paul y Steinwedel. Por su trabajo Paul recibió el Premio Nobel en 1989. Los espectrómetros de masas de triple cuadrupolo se han convertido en instrumentos muy populares para el análisis cualitativo y cuantitativo. Yost y Enke construyeron en 1978 el primer instrumento de triple cuadrupolos y tomó cuatro años, antes que fuese comercializado. El acoplamiento con la cromatografía líquida o cromatografía de gases está bien establecido y las trampas de iones o cuadrupolos hoy en día son parte del equipamiento estándar de muchos laboratorios de análisis (Hoffmann y Stroobant, 2007).

Las características de la espectrometría de masas han elevado a una posición destacada los métodos analíticos: la sensibilidad sin igual, los límites de detección, la

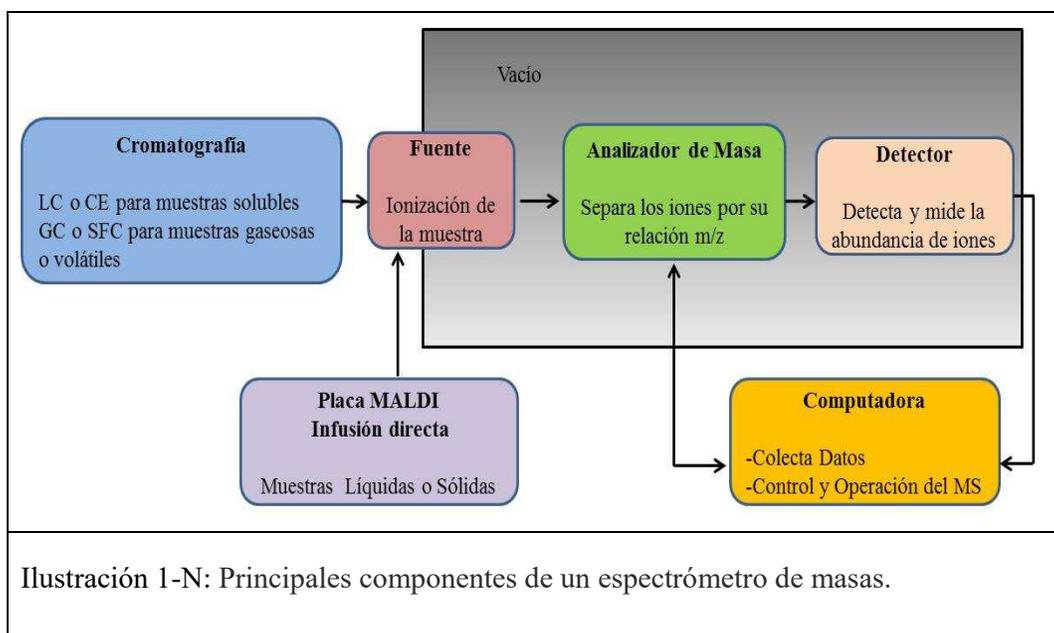
velocidad y la diversidad de sus aplicaciones. En química analítica, las aplicaciones más recientes están orientadas principalmente hacia los problemas bioquímicos, como proteómica, metabolómica y descubrimiento de fármacos. Otras aplicaciones analíticas se aplican rutinariamente en el control de contaminación, control de alimentos, ciencia forense, productos naturales y controles de proceso.

La espectrometría de masas ha progresado rápidamente durante los últimos años. Este progreso ha dado lugar a la aparición de nuevos instrumentos, así como también, nuevas fuentes de ionización, analizadores existentes fueron perfeccionados y nuevos instrumentos híbridos han aparecido por nuevas combinaciones de los analizadores.

1.3.2.1 Espectrómetro de masas

Para el análisis de una muestra por espectrometría de masas (MS), los analitos neutros deben ser ionizados, positiva o negativamente, para permitir la manipulación y separación impuesta por los campos magnéticos y/o eléctricos en el analizador MS. Los iones se clasifican de acuerdo a la relación masa/carga (m/z), la cual se grafica en función de la intensidad para generar un espectro de masas. La trayectoria de vuelo de los iones se realiza en un medio de alto vacío para maximizar la trayectoria libre media de los iones y para reducir la posibilidad de interacciones desfavorables con las moléculas de aire residual. Un espectrómetro de masas siempre contiene los siguientes elementos, tal como se presenta en la Ilustración 1-N (Hocart, 2010):

- una entrada de muestra para introducir el compuesto que es analizado, por ejemplo, un cromatógrafo o una sonda de inyección directa;
- una fuente de ionización para producir iones a partir de la muestra;
- uno o varios analizadores de masa para separar los diversos iones;
- un detector de iones ubicado a la salida del último analizador y finalmente,
- un sistema de procesamiento de datos que produce el espectro de masa en forma adecuada.



1.3.2.2 Métodos de ionización

Antes del análisis de los iones por el espectrómetro de masas, la muestra debe ser volatilizada e ionizada. Estos procesos pueden estar separados o unidos, dependiendo de la naturaleza de la muestra y el proceso de ionización utilizado. Las muestras, para ser analizadas por MS pueden presentarse en forma sólida, líquida o gaseosa y además, pueden ser una mezcla de componentes. En el caso de mezclas, normalmente es necesaria la separación para la identificación sin ambigüedades o cuantificación porque la presencia simultánea de dos o más componentes en la región de fuente dará lugar a una superposición o mezcla de espectros. Las mezclas generalmente son separadas por cromatografía de gases, electroforesis capilar, cromatografía de fluido supercrítico o cromatografía líquida donde los componentes eluidos y separados van directamente a la fuente de iones del MS. Estos acoplamientos se conocen por sus siglas en inglés como GC-MS, CE-MS, SFC-MS y LC-MS, respectivamente (Hocart, 2010).

Si no es necesaria la cromatografía, las muestras se pueden introducir directamente en la fuente de iones. En el caso de muestras gaseosas, la volatilización es por supuesto innecesaria y se pueden introducir en la fuente utilizando técnicas apropiadas de manipulación de gases. Los líquidos y sólidos no polares, térmicamente estables y de bajo peso molecular pueden ser colocados en crisoles de vidrio o metal (sonda de sólidos o sonda de inserción directa) o pueden ser aplicados directamente a través de un bucle (sonda de inyección directa). Algunos compuestos polares de bajo

peso molecular también pueden analizarse directamente después de ser químicamente derivatizados para enmascarar los grupos funcionales polares y por lo tanto aumentar la volatilidad (por ejemplo, por alquilación o silación) y mejorar la estabilidad térmica. De lo contrario, las muestras se pueden disolver en un solvente apropiado y someterse ya sea un proceso de ionización a presión atmosférica o con desorción láser a partir de una matriz sólida.

La interface es la “puerta” de entrada al espectrómetro y el compartimento donde se producen las especies cargadas. La característica general de todas las técnicas de ionización que se utilizan es la transferencia de una cierta energía al analito. Los métodos de ionización pueden separarse en dos grupos: de ionización fuerte y suave.

En las técnicas de ionización fuerte, los iones generados poseen un gran contenido de energía interna residual, tendiendo a la disociación de enlaces químicos y por ende, a la obtención de un gran número de iones fragmento en los espectros de masa. Esto resulta de utilidad desde el punto de vista de la elucidación estructural al encontrarse “iones producto” procedentes del “ion precursor”. En contraparte, los iones precursores intactos, o sea, aquellos que no se fragmentaron, son generalmente poco intensos lo que dificulta la determinación de la masa y la fórmula molecular. El método de ionización fuerte más común es la ionización por electrones (EI).

Las técnicas de ionización suave transmiten una energía interna mínima al analito durante el proceso de ionización, de esta manera los espectros de masa obtenidos exhiben pocos iones fragmento (o iones producto), preservándose mayoritariamente la molécula intacta dando iones precursores relativamente intensos. A pesar de que esto facilita la determinación de la masa molecular, en virtud del número reducido de iones fragmento formado, se obtiene poca información estructural. Entre los métodos de ionización suave se encuentran Ionización Química (CI), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Ionización por Electronebulización (ESI), Fotoionización a Presión Atmosférica (APPI) y la Ionización/Desorción Láser Asistida por Matriz (MALDI), entre los más comunes. En Tabla 1.8 se detallan algunas características de las técnicas de ionización más comunes utilizadas en espectrometría de masas.

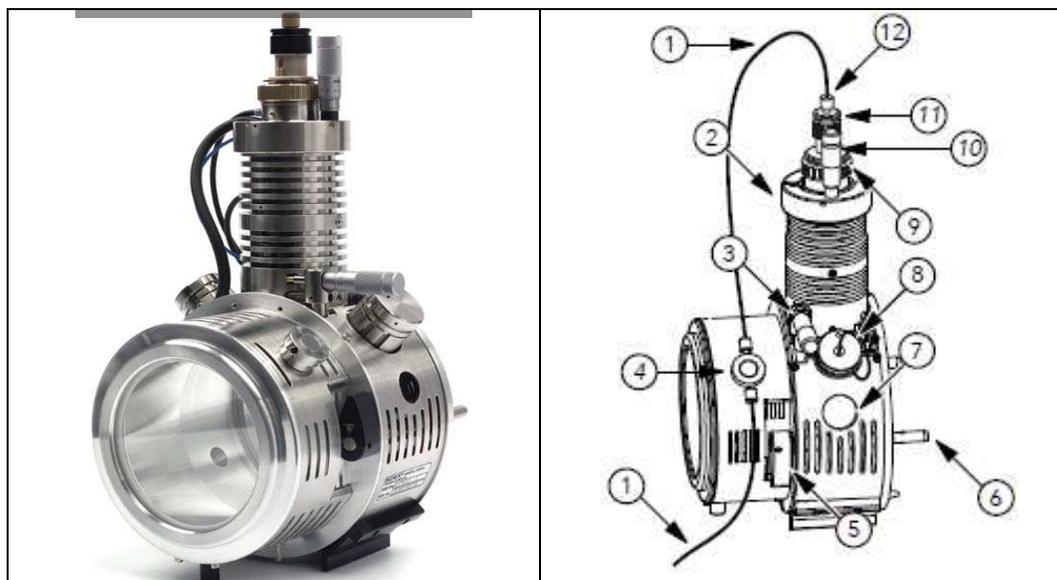
Tabla 1.8: Técnicas de ionización más frecuentemente usadas en espectrometría de masas.

Técnica	PM	Ventajas	Desventajas	Tipo de compuestos
EI	1000	Amplia disponibilidad Utilidad de fragmentaciones Alta sensibilidad Fácil acoplamiento GC-MS	Bajo límite de PM Puede haber demasiada fragmentación	Moléculas pequeñas No polares Térmicamente estables
CI	1000	Fácil acoplamiento GC-MS	Bajo límite de PM Requiere uso de gases de alta pureza	Moléculas pequeñas No polares Térmicamente estables
APCI/ APPI	2000	Alta disponibilidad Alta sensibilidad Fácil acoplamiento LC-MS	Bajo límite de PM	Moléculas no polares a medianamente polares Metabolitos, toxinas Péptidos pequeños
ESI	200000	Cargas múltiples Alta capacidad LC-MS Alta sensibilidad Técnica más suave	Cargas múltiples Sensible a condiciones experimentales (sales, pH, etc.)	Proteínas Carbohidratos Nucleótidos Moléculas polares
MALDI	450000	Tolerancia de mezclas Alta sensibilidad	Requiere matriz Interferencia de la matriz	Proteínas Carbohidratos Nucleótidos Moléculas polares Polímeros

1.3.2.3 Fuentes de ionización

En las fuentes de ionización a presión atmosférica (API) los iones se producen a presión atmosférica y son transferidos a la zona de vacío. Algunas fuentes API son capaces de ionizar moléculas neutras en solución o en fase de gaseosa antes de la transferencia de iones al espectrómetro de masas. Debido a que no se introducen líquidos en el espectrómetro de masas, estas fuentes son particularmente atractivas para el acoplamiento de la cromatografía líquida con espectrometría de masas. Sin embargo, la ionización por electronebulización, ionización química a presión atmosférica, o

fotoionización a presión atmosférica son las técnicas más ampliamente utilizadas (Wanner & Höfner, 2007). En la Ilustración 1-O se presenta la fuente de iones ESI utilizada para el desarrollo de esta tesis.



1. Tubo de entrada de muestra
2. Torre de la sonda
3. Perilla de ajuste del eje de abscisas (x) para ajustar la sensibilidad
4. Base de unión de tuberías
5. Pestillos que asegura la fuente de iones al espectrómetro de masa
6. Guía para anclaje de sonda
7. Ventana
8. Calefactores
9. Rosca de bronce
10. Perilla de ajuste del eje de ordenadas (y) para ajustar la sensibilidad
11. Tuerca de ajuste del electrodo
12. Tuerca de tubería de muestra

Ilustración 1-O: Componentes de la fuente de iones Turbo VTM (AB SCIEX®).

El muestreo de iones a partir de la región de presión atmosférica a la región de alto vacío del analizador de masas requiere una reducción de presión significativa. Una corriente de gas introducida dentro del sistema de vacío se expande y se enfría. Cuando esta corriente de gas contiene iones y vapores de solvente se observa la formación de

grupos o agregados de iones-solvente. Para obtener una buena sensibilidad y espectros de alta calidad una de las principales funciones de la interfaz es evitar la formación de agrupaciones. La Ilustración 1-P muestra una interfaz, donde el espacio entre el orificio y el plato cortina se purga con nitrógeno calentado previamente. Los iones son movidos a través del gas cortina dentro del analizador de masas con la ayuda de un campo eléctrico formado entre la placa cortina y el orificio. De esta manera, las moléculas de solvente neutro no pueden penetrar a la región de alto vacío, lo que impide la formación de agregados de iones.

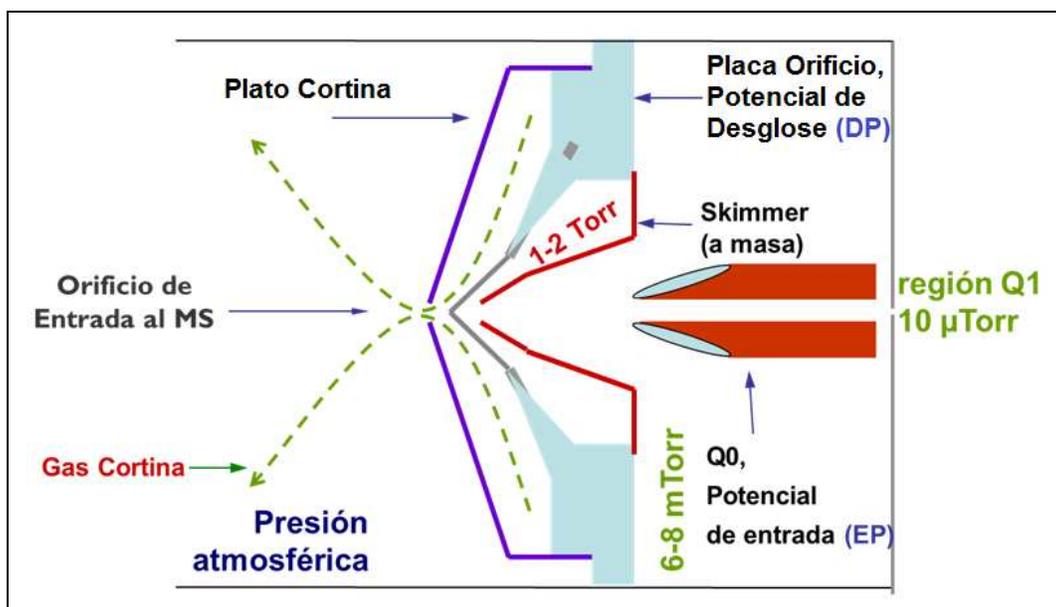


Ilustración 1-P: Interfaz de vacío (API 3200 AB Sciex) a presión atmosférica de bombeo de una sola etapa con gas cortina. El tamaño del orificio es aproximadamente 100 μm, Q0 actúa como un cuadrupolo de enfoque y el gas cortina (N₂) previene que moléculas neutras se introduzcan en el espectrómetro de masas. La diferencia de presiones se debe al vacío proporcionado por la bomba mecánica.

1.3.2.3.1 Ionización por electronebulización

La ionización por electronebulización (ESI) es un método por el cual solutos presentes en solución pueden ser transferidos a la fase gaseosa como iones. Los iones en fase gaseosa pueden ser detectados por medio de espectrometría de masas (ESI-MS). Sorprendentemente, ESI puede manejar solutos tales como polímeros, ácidos nucleicos y proteínas que tienen una masa molecular elevada. Los analitos presentes en la disolución pueden ser iones, tales como iones metálicos inorgánicos, aminas protonadas o iones negativos tales como iones haluro, ácidos carboxílicos desprotonados y sulfatos.

También pueden ser compuestos que son neutros en la solución que es nebulizada. En este caso, el analito se carga por asociación con uno o más iones presentes en la solución. Este proceso de carga forma parte del mecanismo de electronebulización. ESI-MS es el método ideal para la detección de analitos de cromatografía líquida de alta resolución o electroforesis capilar. ESI-MS es particularmente valiosa para la investigación bioquímica, biomédica y farmacológica. La importancia de ESI-MS fue reconocida por un Premio Nobel en 2002 a John Fenn, quien fue el mayor desarrollador del método (Cole, 2010).

ESI superó dos problemas principales que limitaron el uso de LC-MS, siendo ellos los siguientes:

- a) La incapacidad para ionizar, en un estado intacto, muchas moléculas lábiles y/o no volátiles.
- b) La falta de equipos adecuados, para permitir el análisis de masas y detección eficaz de los iones de alta relación m/z .

La Ionización producida por la interface de electronebulización comprende las siguientes cuatro etapas (Ardrey, 2003):

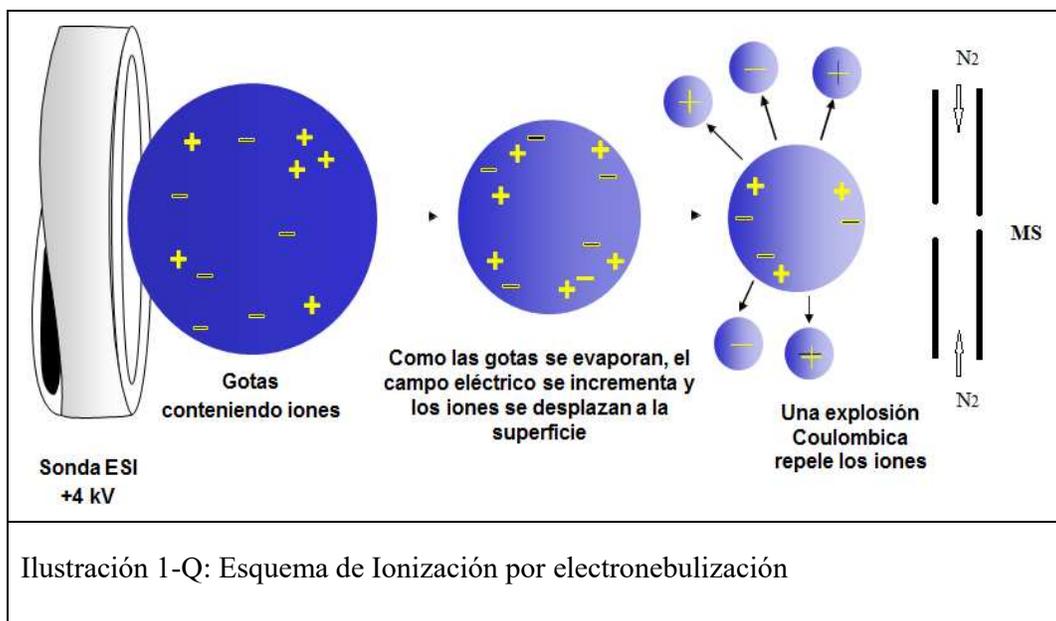
- 1) Formación de finas gotas a partir del eluato del cromatógrafo líquido
- 2) Carga de estas gotas
- 3) Desolvatación de las gotas
- 4) Formación de iones de analito

Se han propuesto dos mecanismos para explicar la formación de iones de fase gaseosa a partir de gotas muy pequeñas y muy cargadas:

- ✓ El primer mecanismo, propuesto por Dole y colaboradores en 1968, depende de la formación de gotas extremadamente pequeñas que podrían contener una molécula de analito y algunas cargas iónicas. La evaporación de solvente a partir de tales pequeñas gotas conducirá a un ion de analito en fase gaseosa cuya carga se origina a partir de las cargas en la superficie de la gota desaparecida. Esta suposición se conoce ahora como el Modelo de Residuos Cargados (CRM). El apoyo temprano para el mecanismo fue proporcionado por Rollgen y colaboradores (Cappiello, 2006; Cole, 2010).

- ✓ El segundo mecanismo, propuesto por Iribarne y Thomson en 1976 para la producción de iones de fase gaseosa a partir de pequeñas gotas cargadas, se conoce como Modelo de Evaporación de Iones (IEM) el cual predice que, después de que los radios de las pequeñas gotas disminuyen hasta un tamaño dado, es posible la emisión directa de iones de las pequeñas gotas. Este proceso, que denominaron evaporación de iones, se hace dominante sobre la fisión de Coulomb para gotas con radios de <10 nm (Cole, 2010).

En contraste con la mayoría de otros métodos de ionización, la mayoría de los iones producidos por electronebulización son de cargas múltiples ($[M + nH]^{n+}$ o $[M - nH]^{n-}$, siendo M el peso molecular del compuesto y n el número de protones adicionados o sustraídos). Esto es de gran importancia ya que el espectrómetro de masas mide la relación m/z de un ion, por lo tanto, el rango de "masa" de un instrumento se puede extender de manera efectiva por un factor equivalente al número de cargas que reside en la molécula de analito, es decir, un ión de m/z 1000 con 20 cargas se deriva de un compuesto con un peso molecular de 20000 Da. Los espectros generados por ionización en fuente de electronebulización se producen haciendo pasar una corriente de líquido a través de un capilar de metal, el cual se mantiene a alta tensión (típicamente 3-5 kV para la producción de iones positivos y valores ligeramente menores de polaridad opuesta para la producción de iones negativos - Ilustración 1-Q). Esta alta tensión dispersa el flujo de líquido, formando una niebla de gotas altamente cargadas que se someten a la solvatación durante su paso a través de la fuente del espectrómetro de masas.



A medida que el tamaño de la gota se reduce, se alcanza un punto (dentro de 100 μs) en el que las fuerzas de repulsión entre las cargas en la superficie de las gotas son suficientes para superar las fuerzas de cohesión de la tensión superficial. Se produce entonces una 'explosión Coulombica', arrojando un número de gotas más pequeñas con un radio de aproximadamente 10% respecto de la gota principal. Una serie de tales explosiones, se llevan a cabo hasta el punto al cual los iones de analitos disueltos en esas gotas son producidos y transferidos a través de una serie de dispositivos de enfoque (lentes) en el espectrómetro de masas.

Los iones son acelerados en el espectrómetro de masas debido al potencial aplicado y al vacío en el analizador. Los grupos restantes se rompen por una cortina de N_2 (gas de cortina) que también previene al alto vacío de moléculas de solvente.

La desolvatación de las gotas formadas y por lo tanto la ionización de analitos, se ve favorecida por la producción inicial de pequeñas gotas. Por esta razón, se debe evitar una fase móvil con alta tensión superficial y/o de alta viscosidad, lo que explica por qué el agua pura no es una fase móvil deseable. La aplicación de voltajes muy elevados a la aguja de ionización por electronebulización resultará en la producción de gotas más pequeñas, pero en última instancia conducirá a la formación de una descarga de alta tensión en lugar de la formación de gotas. Este parámetro debe ser optimizado para una fase móvil en particular durante el procedimiento de puesta a punto decisivo antes de un análisis.

La concentración de solución reguladora también afecta directamente el tamaño de las pequeñas gotas producidas, cuanto mayor es la concentración más pequeña serán las mismas, lo cual es deseable. La concentración de solución reguladora, sin embargo, tiene un efecto sobre la eficiencia de ionización y a altas concentraciones ($> 10^{-3}$ M) la relación entre la respuesta del detector y la concentración de analito no es lineal, esta situación debe evitarse para mediciones cuantitativas precisas.

La velocidad de flujo de líquido en el sistema HPLC-ESI es de suma importancia para determinar el rendimiento tanto desde la perspectiva de espectrometría de masas como así también cromatográfica. La velocidad de flujo afecta tanto al tamaño y distribución de tamaño de las gotas formadas durante el proceso de electronebulización (no todas las pequeñas gotas son del mismo tamaño) y, en

consecuencia, el número de cargas de cada gota, lo cual tiene un efecto sobre la aparición del espectro de masas que se genera.

1.3.2.4 Analizadores de masas

Una vez que los iones producidos se encuentran en fase gaseosa, necesitan ser separados de acuerdo a sus masas y cargas. La propiedad física de los iones que se mide mediante un analizador de masa es la relación m/z en lugar de su masa solamente. Por lo tanto, se debe mencionar que para iones con múltiples cargas los valores aparentes de m/z son partes fraccionarias de sus masas reales.

Como hay una gran variedad de fuentes, se han desarrollado varios tipos de analizadores de masas (Hoffmann y Stroobant, 2007). En efecto, la separación de iones de acuerdo con su relación m/z se puede basar en diferentes principios (Tabla 1.9). Todos los analizadores de masas utilizan campo eléctrico y magnético, estático o dinámico que puede estar solo o combinado. La mayoría de las diferencias básicas entre los diversos tipos de analizadores se basa en la forma en que se utilizan dichos campos para conseguir la separación.

Tabla 1.9: Tipos de analizadores utilizados en espectrometría de masas.

Tipo de Analizador	Símbolo	Principio de Separación
Sector Eléctrico	E o ESA	Energía cinética
Sector Magnético	B	Momento lineal
Cuadrupolo	Q	m/z (Estabilidad de trayectoria)
Trampa de Iones	IT	m/z (Frecuencia de resonancia)
Tiempo de Vuelo	TOF	m/z (Tiempo de vuelo)
Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier	FTICR	m/z (Frecuencia de resonancia)
Orbitrap con Transformada de Fourier	FT-OT	m/z (Frecuencia de resonancia)

Cada analizador de masa tiene sus ventajas y limitaciones y se pueden dividir en dos grandes clases sobre la base de muchas de sus propiedades. Los analizadores de

escaneo que transmiten iones de diferentes masas sucesivamente a lo largo de una escala de tiempo. Estos pueden ser: a) instrumentos de sector magnético con un tubo de vuelo en el campo magnético que permite transmitir, en un momento dado, sólo a los iones de una relación m/z específica, o b) instrumentos de cuadrupolo. Sin embargo, otros analizadores permiten la transmisión simultánea de todos los iones, tales como el analizador de dispersión magnética, el analizador de masas de tiempo de vuelo y los analizadores de masas de iones atrapados que corresponden a las trampas de iones, la resonancia ciclotrónica de iones o los instrumentos orbitrap. Los analizadores se pueden agrupar en función de otras propiedades, por ejemplo, haz de iones contra los tipos de atrapamiento de iones, análisis continuo versus pulsado, bajos o altas energías cinéticas.

Las cinco características principales para medir el desempeño de un analizador de masas son el rango de masa, la velocidad de análisis, la transmisión, la exactitud de masa y la resolución (Hoffmann y Stroobant, 2007).

El rango de masas determina el límite de m/z sobre el cual el analizador puede medir iones. Se expresa en Thomson (Th), o en unidades de masa atómica (u) para un ión que lleva una carga elemental, o sea $z = 1$.

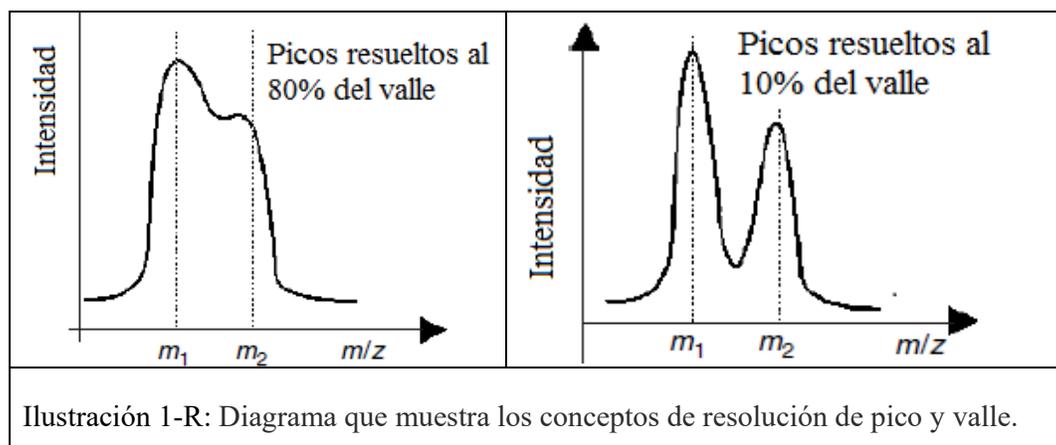
La velocidad de análisis, también llamada la velocidad de escaneo, es la velocidad a la que el analizador mide un rango particular de masa. Se expresa en unidades de masa por segundo (u/s) o en unidades de masa por milisegundo (u/ms).

La transmisión es la relación entre el número de iones que llega al detector y el número de iones que entran en el analizador de masa. La transmisión incluye generalmente las pérdidas de iones a través de otras secciones del analizador de masas tales como lentes eléctricas antes y después del analizador. Esto no debe confundirse con el ciclo de trabajo. El ciclo de trabajo es la proporción de tiempo durante el cual es operado de manera útil un dispositivo o sistema. Para un espectrómetro de masas, el ciclo de trabajo es la parte de los iones de una particular m/z producido en la fuente que se analizan de manera eficaz. El ciclo de trabajo se puede expresar como una relación o como un porcentaje. El mismo espectrómetro de masas puede tener diferentes ciclos de trabajo, ya que tiene una alta dependencia con el modo de funcionamiento.

La exactitud de masa indica la diferencia que se observa entre el m/z teórico ($m_{\text{teórico}}$) y el m/z medido (m_{medido}). Se puede expresar en mili unidades de masa (mmu), pero a menudo se expresa en partes por millón (ppm). La exactitud de masa está

vinculada en gran medida a la estabilidad y la resolución del analizador. Un instrumento de baja resolución no puede proporcionar una gran exactitud. La alta exactitud de masa tiene aplicaciones significativas tales como la determinación de la composición elemental.

Por último, pero no menos importante, es la característica de un analizador de masas respecto a la resolución o su poder de resolución que es la capacidad del analizador de masas para producir señales distintas para dos iones con una pequeña diferencia de m/z .



Tal como se muestra en la Ilustración 1-R, dos picos se consideran resueltos si el valle entre ellos es igual a 10% de la intensidad del pico más débil cuando se utilizan instrumentos de resonancia magnética o resonancia ciclotrónica de iones y de 50% cuando se utiliza cuadrupolos, trampas de iones y tiempos de vuelo. Si Δm es la menor diferencia de masa para que se resuelven dos picos con masas “ m ” y “ $m + \Delta m$ ”, la definición del poder de resolución (R) se expresa según Ecuación 12 como:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad \text{Ecuación 12}$$

Por lo tanto, un mayor poder de resolución corresponde a la mayor capacidad de distinguir iones con una diferencia de masa más pequeña.

El grupo de analizadores de masa de baja resolución incluye a los cuadrupolos (Q) y a las trampas iónicas de varios tipos, como las cuadrupolares (QIT). Generalmente, se dice que tienen resolución unitaria, lo que significa que pueden resolver iones que difieren en una unidad de masa, aunque típicamente su resolución es un poco mejor. Su bajo precio y tamaño, así como sus altas velocidades de barrido, les provee versatilidad para aplicaciones en espectrometría de masa tándem. El desarrollo

de analizadores de alta resolución, como el tiempo de vuelo (TOF), y de ultra-alta resolución como el Orbitrap y la resonancia iónica ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICR), ha posibilitado medidas de masa precisas (<5 ppm para el TOF) y ultra-precisas (<1 ppm para el Orbitrap y FT-ICR), siendo la tendencia actual el reemplazo de los sectores magnéticos de gran tamaño por los otros analizadores mucho más compactos mencionados con anterioridad. Debido a que cada tipo de analizador está basado en principios significativamente diferentes, cada uno tiene propiedades y especificaciones únicas. Las principales características de los diferentes analizadores se resumen en la Tabla 1.10.

Tabla 1.10: Comparación de analizadores de masas.

Parámetro	Q	QIT	TOF	TOF con Reflectrón	B	FTICR	Orbitrap
Límite de masa (Th)	4000	6000	>100000	>10000	>20000	>30000	>50000
Resolución							
FWHM* (m/z 1000)	2000	4000	5000	20000	100000	500000	100000
Exactitud (ppm)	100	100	200	10	10	< 5	< 5
Muestreo de Iones	Continuo	Pulsado	Pulsado	Pulsado	Continuo	Pulsado	Pulsado
Presión (Torr)	10^{-5}	10^{-3}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-10}	10^{-10}
	QqQ	-	-	TOF/TOF	B/B	-	-
	MS/MS	MS ⁿ	-	MS/MS	MS/MS	MS ⁿ	-
	Fragmentos	Fragmentos	-	Fragmentos	Fragmentos	Fragmentos	-
Masa en tándem	Precursores			-	Precursores	-	
	Pérdidas neutras			-	Pérdidas neutras	-	
	Baja energía de colisión	Baja energía de colisión	-	Baja o alta energía de colisión	Alta energía de colisión	Baja energía de colisión	-

* Resolución al 50% de altura máxima, FWHM por "full width half mass".

1.3.2.5 Introducción al cuadrupolo lineal

Desde la adjudicación del premio Nobel al descubrimiento de las propiedades para análisis de masa y atrapamiento de iones en campos eléctricos cuadrupolares de dos y tres dimensiones y la construcción de un espectrómetro de masas cuadrupolar (Q), este tipo de instrumentos ha ganado cada vez mayor importancia. Principalmente a partir de aplicaciones de GC-MS, donde los dispositivos de escaneo rápido se necesitaban urgentemente, los analizadores cuadrupolares hicieron su camino en los laboratorios de MS, aunque los primeros sistemas ofrecían un bajo poder de resolución y un bajo rango de masa, por ejemplo, m/z 1-200. Los instrumentos cuadrupolares modernos cubren la gama m/z 2000-4000 con un buen poder de resolución y representan algún tipo de dispositivo estándar en LC-MS. Las ventajas de los cuadrupolos son que i) tienen alta transmisión de iones, ii) son ligeros, muy compactos y comparativamente de bajo precio, iii) tienen bajas velocidades de aceleración iónica, y iv) permiten altas velocidades de escaneo, ya que el escaneo se realiza únicamente mediante barrido de potenciales eléctricos (Gross, 2011).

Un analizador de masa cuadrupolar lineal consiste en cuatro barras de electrodos hiperbólicas o cilíndricas que se extienden en la dirección z y montados en una configuración cuadrada (plano xy , Ilustración 1-S, Ilustración 1-T). Los pares de varillas opuestas se mantienen cada uno al mismo potencial que está compuesto de un componente DC (corriente continua) y un componente AC (corriente alterna).

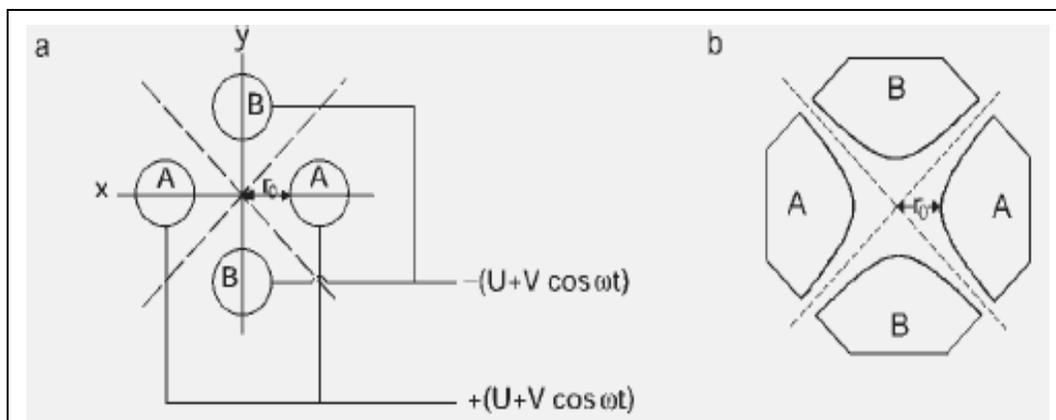
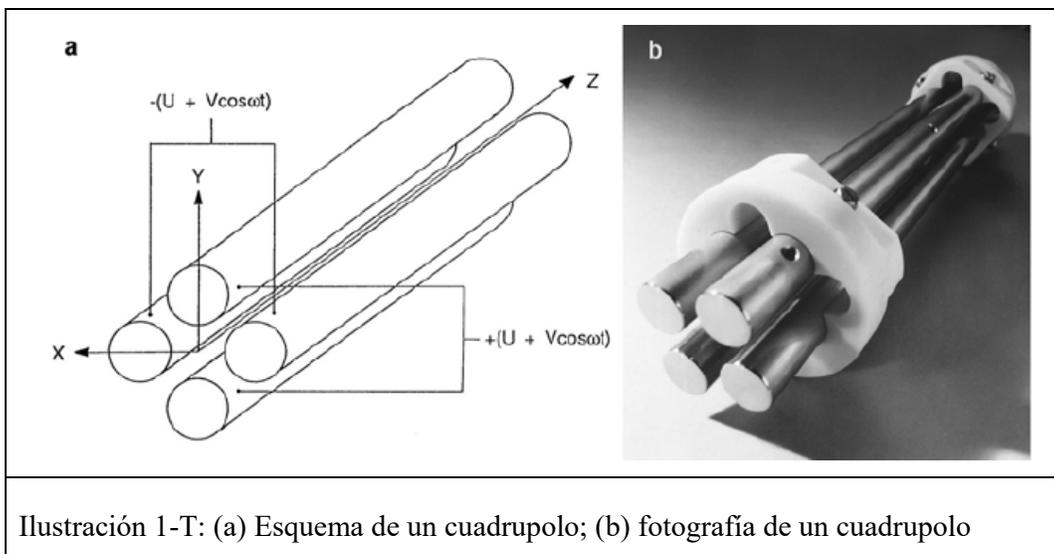


Ilustración 1-S: Sección transversal de un cuadrupolo (a) para la aproximación cilíndrica y (b) para el perfil hiperbólico de barras. El campo eléctrico es cero a lo largo de las líneas de puntos, es decir, a lo largo de las asíntotas en (b).



En las barras de metal opuestas del cuadrupolo se aplica una tensión que consiste en un potencial fijo U (corriente continua directa) y una radiofrecuencia RF alterna, siendo la relación correspondiente:

$$\pm \underbrace{(U)}_{\text{DC}} + \underbrace{V\cos(\omega t)}_{\text{RF}}$$

donde V es la amplitud y ω la frecuencia de la radiofrecuencia (Gross, 2011).

A través de la alternancia de los valores RF y DC y en una proporción fija DC/RF solamente iones con un valor específico de m/z tendrán una trayectoria estable a través del cuadrupolo y todos los demás serán descargados en las barras. Por esta razón el cuadrupolo también es conocido como "filtro de masa".

Las trayectorias de los iones a través del cuadrupolo se pueden describir con las soluciones de la ecuación de Mathieu (Ecuación 13), una ecuación diferencial compleja, y simplificación helicoidal:

$$\frac{d^2u}{d\zeta^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\zeta)u = 0 \tag{Ecuación 13}$$

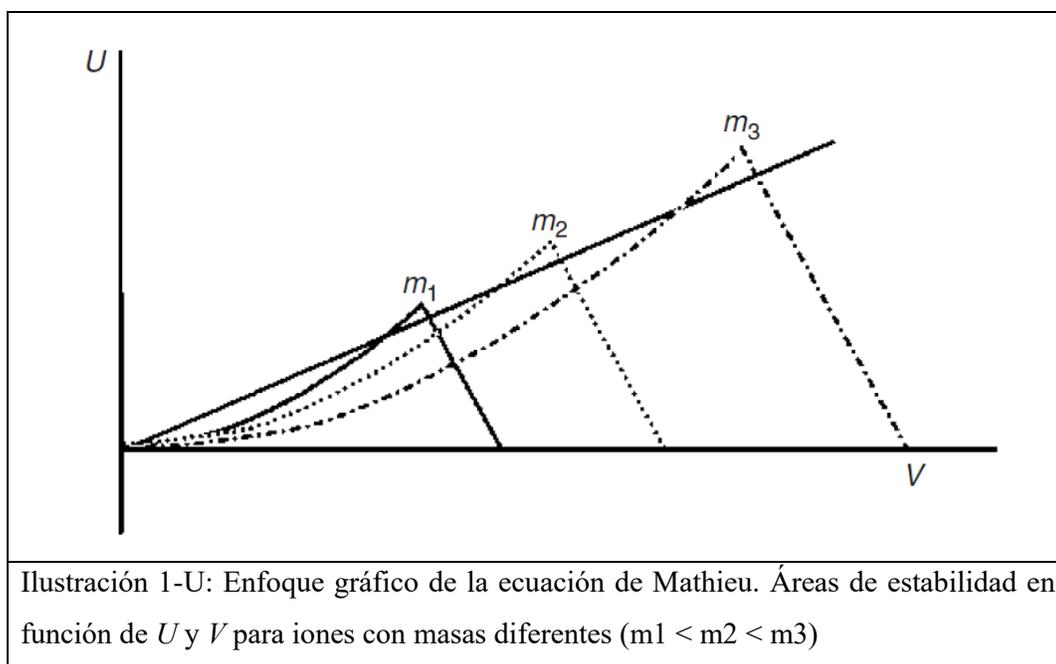
donde $\zeta = \omega \cdot t/2$ (ω = frecuencia RF, t = tiempo), y u representa la posición a lo largo del eje de coordenadas X, Y.

Los parámetros Mathieu a_u y q_u se definen según Ecuación 14 como:

$$a_u = \frac{8eU}{mr_o^2 \omega^2} \text{ y } q_u = \frac{4eV}{mr_o^2 \omega^2} \tag{Ecuación 14}$$

donde e es la carga de un electrón, U es la tensión de DC aplicada, V es la tensión aplicada de cero al pico de RF, m es la masa del ión, y r es el radio efectivo entre los electrodos. Sólo ciertas combinaciones de a y q dan soluciones estables a la ecuación de Mathieu, es decir los iones que pasan a través del cuadrupolo. Además, serán útiles sólo combinaciones de a/q que dan soluciones estables para las direcciones X e Y.

Para familiarizarse con la sensibilidad y la resolución de la espectrometría de masas cuadrupolar, se puede utilizar una solución gráfica de la ecuación de Mathieu. Las soluciones se pueden trazar como diagramas de estabilidad como se muestra a modo de ejemplo en la Ilustración 1-U: para los valores de m/z $m_1 < m_2 < m_3$ (Hoffmann y Stroobant, 2007). Para cada valor de m/z se genera un triángulo y siempre que la relación DC/RF está dentro del límite, permite que el valor específico m/z pase por el cuadrupolo. Las dos líneas rectas en la Ilustración 1-U representan líneas de trabajo del cuadrupolo y operan a una relación constante DC/RF. El funcionamiento con resolución constante del cuadrupolo está representado por la línea recta continua. Cambiando linealmente a U en función de V , obtenemos una línea de operación recta que nos permite observar estos iones sucesivamente. Una línea con una pendiente más alta nos daría una resolución más alta, siempre y cuando pase por las áreas de estabilidad. Manteniendo $U = 0$ (sin potencial directo) obtenemos una resolución cero. Todos los iones tienen una trayectoria estable siempre que V esté dentro de los límites de su área de estabilidad.



Trabajar con resolución constante resulta en el aumento del ancho del pico con el aumento de los valores de m/z , lo que significa una mayor sensibilidad y menor resolución de masa. Normalmente, el cuadrupolo se hace funcionar, como se muestra por la línea recta de puntos, en el modo de resolución unitaria, lo que significa que la línea recta pasa por el origen y cerca del máximo de cada triángulo del respectivo valor m/z .

1.3.2.5.1 Espectrómetros con varios cuadrupolos en tándem

La Ilustración 1-V muestra el diagrama general de un instrumento con tres cuadrupolos. En los espectrómetros de masas de cuadrupolos, los filtros de masa se simbolizan con mayúsculas Q, y los cuadrupolos de RF solamente con una minúscula q . Se puede introducir un gas de colisión en el segundo cuadrupolo a una presión tal que un ion que entra en él sufre una o varias colisiones.

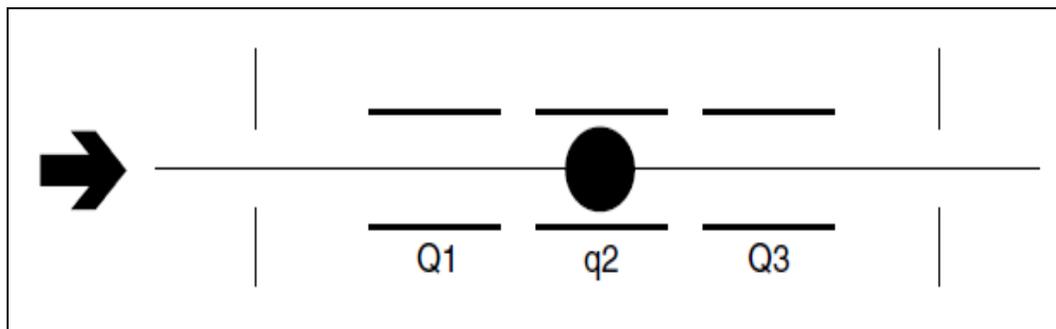
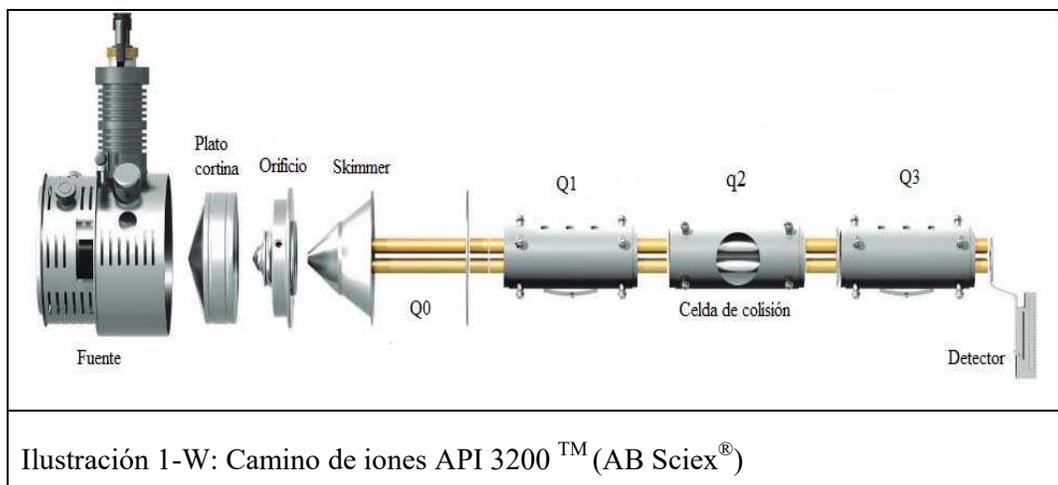


Ilustración 1-V: Diagrama de un instrumento de triple cuadrupolos. El primero y el último son analizadores de masas. El cuadrupolo central, q_2 , es una celda de colisión formada por un cuadrupolo usando solamente RF.

Cuando el gas es inerte, la energía interna es transferida al ion convirtiendo una fracción de la energía cinética en energía interna. Los iones producto y fragmento son analizados por el tercer cuadrupolo (Q3). La energía cinética para las transferencias internas de energía se rige por las leyes relativas a las colisiones de una especie móvil (ion) y un blanco estático (gas de colisión). Las colisiones en estos instrumentos se producen a baja energía. Cuando el gas es reactivo, se pueden inducir reacciones de moléculas iónicas. Los instrumentos con varios analizadores en serie pueden ser escaneados de varias maneras. Los modos de escaneo más importantes se muestran en la Tabla 1.11.

La Ilustración 1-W muestra la ruta de iones del API 3200 (AB Sciex[®]). Q1 y Q3 actúan como cuadrupolos selectivos a las masas o comúnmente llamado filtro de masas. El q2, situado entre Q1 y Q3, es un cuadrupolo RF y actúa como celda de colisión, que se llena con gas inerte, N₂ o Ar. En la celda de colisión (q2) iones seleccionados en Q1 (iones precursores), chocan con el gas inerte y se producen fragmentos (iones producto), los cuales son analizados en Q3. Este proceso se llama disociación inducida por colisión (CID).



El alto vacío evita la colisión de las moléculas ionizadas con "moléculas de aire" y un sistema de lentes eléctricas entre los cuadrupolos asegura que el haz de iones permanezca en el camino. En algunos casos, se puede observar una fragmentación parcial del analito en el cambio de presión atmosférica al vacío, que se conoce como "disociación inducida por colisión en la fuente" (en inglés "In-Source-CID"). Esto puede ocurrir en analitos muy frágiles debido a su aceleración en el espectrómetro de masas.

Además, el espectrómetro de masa de triple cuadrupolo puede usarse como espectrómetro de masas de simple cuadrupolo cuando Q1 y Q3 seleccionan el mismo ion y el gas de colisión se desactiva. Dependiendo del modo de exploración, se pueden generar datos cualitativos y cuantitativos, que van desde la información estructural y la identificación de metabolitos hasta el análisis cuantitativo altamente sensible.

Mayormente el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo se opera en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) y se utiliza para mediciones cuantitativas acoplado a un cromatógrafo de líquidos.

La Tabla 1.11 muestra los modos de exploración típicos del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

Tabla 1.11: Modos de escaneo en espectrómetros de masa de triple cuadrupolos.

Modo de Escaneo	Q1	q2	Q3	Propósito
Escaneo Completo	escaneo	Transmisión total	Transmisión total	Información PM
Monitoreo de ión seleccionado (SIM)	m/z fijo	Transmisión total	Transmisión total	Cuantificación
Ion Producto	m/z fijo	Transmisión total (+ EC)	escaneo	Información Estructural
Monitoreo de ión seleccionado (SRM)	m/z fijo	Transmisión total (+ EC)	m/z fijo	Cuantificación Específica
Pérdidas Neutras	Escaneo entre Q1 y Q3 con una diferencia de m/z específica (+ EC)			Búsqueda de Compuestos
Ion Precursor	escaneo	Transmisión total (+ EC)	m/z fijo	Búsqueda de Fragmentos específicos

EC: Energía de colisión

1.3.2.6 Efecto matriz

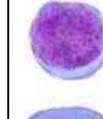
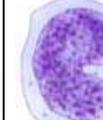
En bioanálisis, los componentes de la matriz presentes en las muestras biológicas pueden afectar a la respuesta del analito de interés. Estos fenómenos, denominados generalmente efecto matriz, pueden dar lugar a la cuantificación inexacta y son, por lo tanto, importantes de abordar en el desarrollo y validación de métodos bioanalíticos. Algunos de los procedimientos de preparación de muestras han sido de gran importancia en la reducción del efecto de matriz. Sin embargo, la demanda de sensibilidad elevada debido a la evaluación de fármacos cada vez más potentes y la detección de concentraciones de biomarcadores extremadamente baja, hace necesario un método eficaz de preparación de muestras. La selección de preparación de muestra para minimizar el efecto de la matriz se determina en gran medida por el tipo de muestra y la plataforma de análisis utilizada para la detección del analito. Además de los diversos

parámetros del protocolo de preparación de muestra para la reducción del efecto matriz, es deseable que estos métodos sean simples, rápidos y rentables. También es importante disponer de métodos que pueden ser fácilmente automatizados e integrados en el módulo de análisis. Ha habido éxito en acoplamiento de métodos de extracción de fase sólida (SPE) en línea con métodos de cromatografía líquida y espectrometría de masas tándem (LC-MS/MS), permitiendo la creación de sistemas totalmente automatizados para la detección de analitos en orina, suero y plasma. Para muestras de sangre entera, sin embargo, la eliminación de insolubles (células de la sangre o restos de células a partir de la hemólisis) es necesaria antes de la inyección de la muestra.

Cada matriz biológica presenta diferentes retos de proceso, y cada tipo de método analítico se ve afectado por componentes de la matriz de forma diferente. El principal efecto matriz asociado con los métodos LC-MS/MS es la supresión iónica (Murray y col., 2013) causada por la co-elución de los componentes de la matriz. Este efecto puede ser causado por sustancias endógenas orgánicas e inorgánicas, incluyendo sales, hidratos de carbono, aminas, urea, lípidos, péptidos y metabolitos. Sustancias exógenas, tales como medios de dosificación, agentes de formulación y anticoagulantes, también pueden dar lugar a la supresión de iones. La supresión de iones fue reportada por primera vez por Kebarle y Tang a principios de 1990. Se han propuesto diferentes mecanismos y combinación de ellos, para explicar este fenómeno. Una posible explicación es que los compuestos de matriz compiten con el analito por la carga limitada en las superficies de las pequeñas gotas y, por lo tanto, afectan a la ionización del analito. Otra posible explicación es que los compuestos de interferencia aumentan la viscosidad y la tensión superficial de la gota, lo que disminuye la velocidad de evaporación del solvente. Como resultado, una menor cantidad de analito es capaz de alcanzar la fase de gas. También se ha sugerido que los componentes no volátiles en la matriz pueden disminuir la velocidad de formación de gotas y, por lo tanto, evitar que las gotas lleguen al radio crítico requerido para permitir la formación de iones en fase gaseosa. El efecto matriz a menudo es evaluado por la infusión constante con bomba de jeringa post-columna de analito después de la inyección inicial de un extracto de muestra. Se da una valoración cualitativa y puede identificar regiones cromatográficas que son propensas a ser influenciadas por los efectos de la matriz. En el método de fortificación post-extracción, se comparan las respuestas de analito en solución y en blanco de matriz, proporcionando una evaluación cuantitativa de los efectos de la matriz (Chiu y col., 2010).

La sangre entera tiene una de las matrices más complejas (Tabla 1.12). Muchos componentes de la matriz pueden afectar a la respuesta de la señal de un proceso bioanalítico.

Tabla 1.12: Contribuyentes comunes al efecto matriz en sangre.

Plasma	Células					
	Eritrocitos ~8 μm	Leucocitos 7 – 20 μm				Plaquetas 2 – 5 μm
		Granulocitos			Agranulocitos	
		Basófilos	Eosinófilos	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos
Agua						
Proteínas						
Electrolitos						
Glucosa						
Aminoácidos						
Lípidos						
Hormonas						
Desechos						
Gases						

Las proteínas del suero a menudo se unen de forma no específica a analitos lo que resulta en una sensibilidad reducida. Los fosfolípidos endógenos se han identificado como una fuente importante de efectos matriz en el análisis por LC-MS. Anticoagulante, que se utilizan en la extracción de sangre para evitar la coagulación de la misma, se ha encontrado que tienen un efecto significativo sobre la extracción y el análisis por LC-MS/MS. La alta viscosidad de la sangre también altera la eficacia de la unión y especificidad para la detección. Un factor de complicación final en el procesamiento de sangre es que la eliminación de células sanguíneas o residuos celulares de hemólisis es necesaria para el análisis. La centrifugación y la filtración, son dos técnicas convencionales para la separación de células sanguíneas, pero difíciles de implementar en un formato automatizado (Chiu y col., 2010).

1.3.3 Preparación de muestras biológicas

Entre los requisitos para desarrollar estudios de BD y BE se encuentra contar con metodologías analíticas rápidas, selectivas, robustas y validadas para el trabajo con

muestras en fluidos biológicos las cuales se denominan comúnmente metodologías bioanalíticas.

La preparación de muestras es una parte crítica del proceso analítico. La principal dificultad para reconocer los principios científicos de la preparación de muestras es que los fundamentos de la extracción, que incluyen muestras reales y frecuentemente complejas, están mucho menos desarrollados y comprendidos que los sistemas fisicoquímicamente más simples utilizados en las etapas de separación y cuantificación del proceso analítico, tales como cromatografía y espectrometría de masas. Por lo tanto, el desarrollo de procedimientos de preparación de muestras es frecuentemente considerado más como un "arte" que como una "ciencia". Dado su importancia en el éxito general del análisis, los progresos en la ciencia de preparación de muestras tienen la promesa de proporcionar importantes avances en el desarrollo del método analítico. Hasta hace muy poco, la preparación de la muestra se ha basado en enfoques muy simples de "baja tecnología", mientras que los problemas más desafiantes científicamente asociados con la matriz han sido ignorados. Esta situación está cambiando actualmente con la introducción de tecnologías no tradicionales, que abordan la necesidad de alternativas sin solventes, automatización y miniaturización. Estos enfoques son frecuentemente más simples de operar, pero más difíciles de optimizar, requiriendo más conocimientos fundamentales por parte del químico analítico no sólo sobre las condiciones de equilibrio, sino sobre la cinética de la transferencia de masa en los sistemas de extracción (Pawliszyn y Lord, 2010).

Las muestras biológicas y los productos farmacéuticos son muy complejos, a menudo contienen proteínas, sales, ácidos, bases y numerosos compuestos orgánicos con química similar a los analitos. Además, estos analitos están a menudo presentes en las muestras a bajas concentraciones. Por lo tanto, la preparación de la muestra es usualmente necesaria para extraer y aislar los analitos en matrices complejas con el fin de favorecer la sensibilidad y selectividad instrumental empleada para la determinación de los analitos. Para el análisis de fármacos se usan muchos métodos de preparación de muestras, incluyendo precipitación de proteínas (PP), extracción líquido-líquido (LLE por sus siglas en inglés), extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés), microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés), extracción con sorbente de afinidad y extracción basada en membrana. Cada paso puede usarse solo o en combinación con otros métodos (Pawliszyn y Lord, 2010).

A continuación, se presentan las técnicas de preparación de muestras utilizadas en el presente trabajo de tesis.

1.3.3.1 Precipitación de proteínas

Para el análisis de fármacos en fluidos o tejidos biológicos, a menudo se deben eliminar las proteínas de la matriz de la muestra antes de un proceso de extracción adecuado y/o análisis por HPLC. Los enfoques de desproteínización incluyen el uso de: (1) temperaturas extremas, fuerzas osmóticas o iónicas, o pH; (2) agentes de precipitación orgánicos; o (3) enzimas proteolíticas. Comúnmente los procedimientos de desproteínización implican la desnaturalización de proteínas por ácidos tales como ácido tricloroacético, ácido perclórico y ácido sulfosalicílico; el uso de temperaturas extremas de 90 - 100 °C o ciclos de congelado-descongelado; y coprecipitación con bases tales como hidróxido de cinc. Sin embargo, tales precipitadores rara vez logran precipitar más del >80% del contenido proteico de la muestra, sumado a que muchos de ellos no son compatibles con el sistema de detección. Los disolventes orgánicos miscibles en agua, tales como acetona, metanol y acetonitrilo, tienen varias ventajas. Las condiciones suaves utilizadas para la precipitación minimizan la posibilidad de descomposición de fármacos lábiles. El metanol se prefiere a menudo porque produce un precipitado floculante, dando como resultado un sobrenadante más claro adecuado para la inyección directa en el HPLC. Aunque el acetonitrilo es el solvente más popularmente usado para precipitación de proteínas de la muestra, su uso se asocia con varios problemas, incluyendo recuperación deficiente, precipitación de proteínas incompleta y presencia de algunas globulinas en solución que pueden reaccionar en el sistema analítico. Además, tales procedimientos, por su naturaleza, diluyen la muestra. Los precipitantes pueden reaccionar en el sistema analítico, eluyendo como un pico en HPLC o interfiriendo en un ensayo espectrofotométrico (Pawliszyn y Lord, 2010).

La técnica más utilizada en bioanálisis se basa en la disminución de la solubilidad mediante la adición de un solvente orgánico ligeramente polar. El agua se caracteriza por su alta constante dieléctrica, lo cual significa que los iones en solución acuosa presentan interacciones más débiles que con otros medios. La adición de un solvente orgánico (metanol o acetonitrilo) produce agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar, esto se debe a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las

proteínas y en consecuencia una disminución en la solubilidad de ésta. La precipitación con solventes se expresa según Ecuación 15 como:

$$\log S = \log S_0 + \frac{K}{D_s^2} \quad \text{Ecuación 15}$$

donde;

- ✓ S = Solubilidad de la proteína
- ✓ D_s = Es la constante dieléctrica de la mezcla solvente-agua, que varía dependiendo de la cantidad de solvente agregada.
- ✓ K = Es una constante que toma en cuenta la constante dieléctrica original del medio acuoso.
- ✓ S_0 = Es la solubilidad extrapolada

En la Tabla 1.13 se presentan constantes dieléctricas (D) de algunos líquidos a 20 °C (Smallwood, 1996). Los requerimientos incluyen que el solvente sea miscible en agua, no debe reaccionar con las proteínas, debe ser un buen agente precipitante y debe ser seguro (flamabilidad del solvente).

Tabla 1.13: Constantes dieléctricas de algunos líquidos a 20 °C.

Líquido	D (20 °C)
Agua	79,7
Acetonitrilo	37,5
Metanol	32,6
Etanol	22,4
Acetona	20,6
Benceno	2,3
Hexano	1,9

1.3.3.2 Extracción en fase sólida

SPE es un método de extracción y concentración de analitos a partir de una matriz líquida. Se basa en la partición de compuestos entre una fase sólida (extracción) y una fase líquida (muestra), por lo que las fuerzas intermoleculares entre las fases influyen en la retención y la elución. SPE ofrece las siguientes ventajas sobre los procedimientos convencionales líquido-líquido: (1) mayor recuperación, (2) concentración más eficaz, (3) menor uso de solvente orgánico, (4) no hay problemas de espuma o emulsión, (5) menor tiempo de preparación de la muestra, (6) operación más fácil, (7) factibilidad de automatizar y (8) procesamiento simultáneo de muchas muestras. SPE también tiene

varias desventajas, incluyendo (1) baja reproducibilidad, (2) dificultad de estandarizar el uso del vacío, (3) naturaleza variable de las etapas de secado, y (4) materiales costosos (Pawliszyn y Lord, 2010).

El procedimiento SPE consiste en cuatro pasos consecutivos:

- 1) acondicionamiento del soporte de SPE
- 2) carga de muestra sobre el soporte de SPE
- 3) lavado del soporte de SPE posterior a la carga de la muestra
- 4) elución de analitos desde el soporte de SPE con solvente apropiado

Para el desarrollo del método, se debe seleccionar un material adsorbente adecuado del cartucho de SPE, solventes de lavado de la muestra y elución del analito apropiado, de acuerdo con las características de la matriz y del propósito de análisis. El solvente de elución del analito debe ser compatible con el instrumento analítico; si no es posible esto último, el solvente de elución puede ser evaporado y luego resuspender el residuo en un solvente adecuado de acuerdo con el instrumental analítico. Varios productos de SPE están disponibles en el mercado, incluyendo cartuchos, discos, membranas y placas. La SPE empaquetada en cartuchos se utiliza generalmente en combinación con colectores de vacío. El volumen del cilindro de la jeringa depende del volumen de la muestra y la cantidad de adsorbente determina la capacidad de la muestra. SPE se puede realizar en línea o fuera de línea con el sistema de detección. El amplio rango de fases sólidas disponibles en el mercado posibilita una correcta elección de acuerdo con la selectividad que se desee, permitiendo la extracción de todos los compuestos de matrices acuosas u orgánicas.

1.3.3.3 Extracción de punto nube

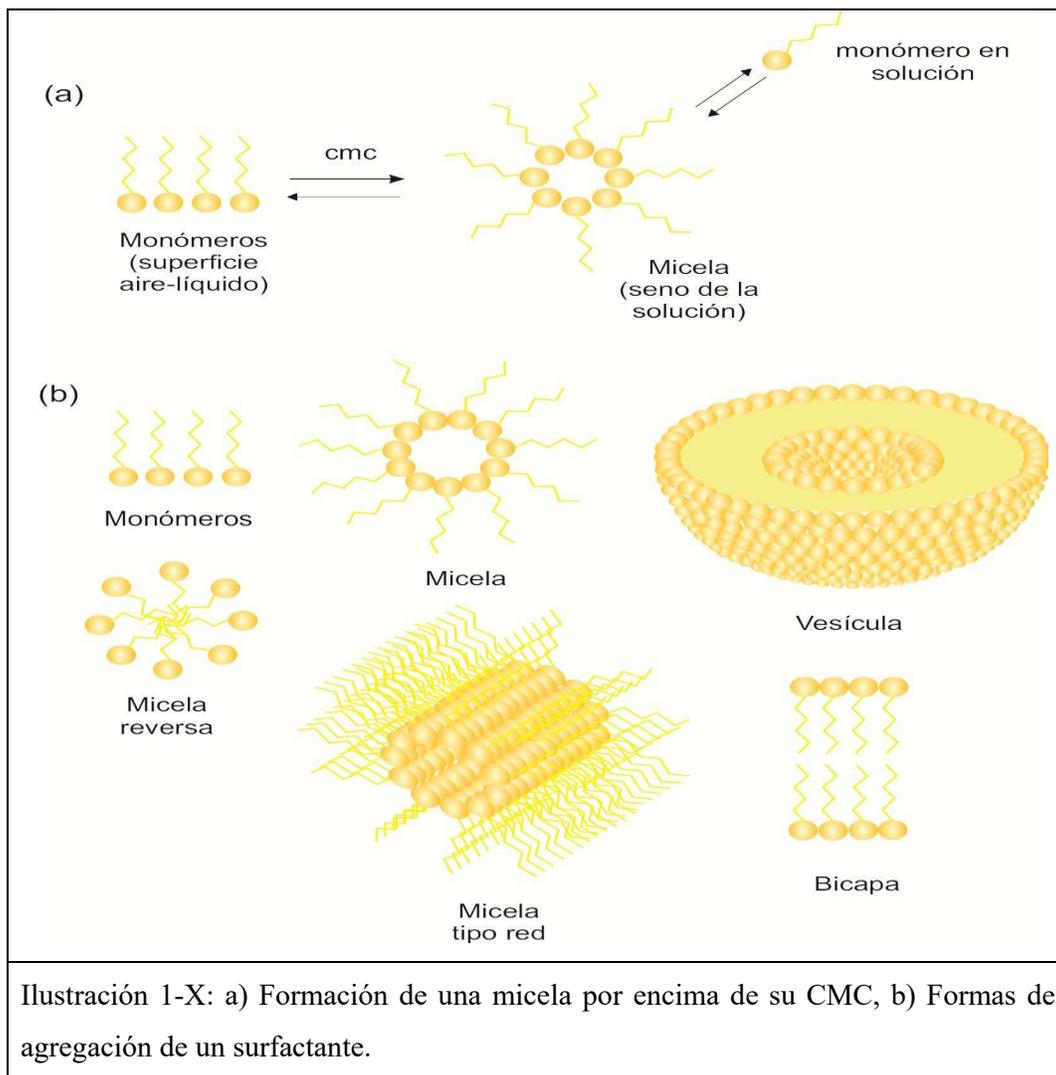
La técnica de Extracción por Punto Nube (CPE por *Cloud Point Extraction*) o extracción mediada por micelas (MME por *micelle-mediated extraction*) fue introducida en el año 1976 (Miura, Ishii, y Watanabe, 1976). La base de CPE reside en el fenómeno de formación de dos fases diferenciadas, mediante la utilización de medios micelares. El fenómeno de extracción tiene lugar cuando se producen determinadas alteraciones en las características de la disolución acuosa de un surfactante, como cambios en la temperatura o en la presión, adición de sales o cualquier otro aditivo, etc. Como consecuencia, se produce la separación o el fraccionamiento de la disolución acuosa del surfactante en:

- ✓ Una fase coacervato que contiene la mayoría del surfactante, denominada “fase rica en surfactante” y

- ✓ Una fase acuosa diluida con una baja concentración de surfactante, próxima a la concentración micelar crítica (CMC).

Los surfactantes son agentes químicos, generalmente, compuestos orgánicos anfílicos, es decir, contienen una región hidrofóbica o apolar y una región hidrofílica o polar. Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico, los surfactantes se clasifican en no iónicos, zwitteriónicos, catiónicos y aniónicos.

Entre las características adherentes a los surfactantes, dependen fuertemente de la concentración con la que se encuentren en solución acuosa, ya que, a una CMC, los surfactantes comienzan a formar agregados micelares que están en equilibrio dinámico con sus monómeros disueltos en solución acuosa. En la Ilustración 1-X se muestran los monómeros de surfactante en equilibrio con las distintas formas de sus micelas (Yazdi, 2011).



La formación de micelas es un proceso altamente dinámico en el que el equilibrio entre el monómero y el agregado se establece en unos pocos milisegundos. Cuando se forman las micelas, su número de agregación es usualmente pequeño (Kim y Shah, 2002).

Los pasos usualmente implicados en el proceso de extracción basado en la separación de fases con la mediación de micelas, son los siguientes:

- ✓ Adición de surfactante a una disolución acuosa que contiene los componentes a ser extraídos o preconcentrados, permitiendo que se produzca la interacción entre los citados analitos y las micelas.
- ✓ A continuación, se alteran las condiciones experimentales, generalmente provocando una modificación en la temperatura de la disolución, adicionando electrolitos o, incluso, otros surfactantes, para conseguir que a partir de la disolución micelar se separen las fases rica en surfactante y diluida. La separación de fases se ve favorecida por la diferencia de densidad entre las fases y tiene lugar por simple decantación por acción de la gravedad. Para acelerar la separación de las fases se puede recurrir a la centrifugación.

Con la finalidad expuesta, la cantidad de surfactante añadida debe ser tal que asegure la formación de agregados micelares en disolución, es decir la concentración final del surfactante debe ser superior a su CMC. Dado que las CMC de los surfactantes no iónicos son bastantes bajas, sólo hay que añadir una pequeña cantidad del surfactante puro, o una pequeña alícuota de una disolución concentrada de surfactante a la disolución que contiene la muestra a analizar.

1.3.4 Validación de metodologías bioanalíticas

Los métodos analíticos desarrollados u optimizados se aplican en el análisis de muestras reales solo después de haber comprobado su validez tras ensayos y errores. Un requisito sumamente importante para cada procedimiento analítico es demostrar que mediante su aplicación es posible determinar cuali-y/o cuantitativamente lo que el analista espera en un tipo específico de muestra. A esta demostración se la llama validación de un método analítico (Rubinson y Runbinson, 2001).

La validación de una metodología analítica es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño (veracidad, precisión,

especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango lineal, etc.) que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas (United State Pharmacopoeia, 2014).

La calidad y la confiabilidad de los resultados analíticos de las muestras obtenidas en los estudios farmacocinéticos de BE constituyen uno de los factores más críticos en el desarrollo de los mismos ya que requiere de la determinación de bajas concentraciones de drogas en matrices complejas. Teniendo en cuenta que los estudios de BE involucran voluntarios humanos, para cuantificar las muestras biológicas, se debe asegurar que el método bioanalítico ha sido debidamente validado de manera de obtener resultados confiables y consistentes.

La concentración de analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, a saber (Quattrocchi y col., 1992):

- Normalización interna (Estandarización interna)
- Estándar externo
- Estándar interno
- Estándar agregado

La selección del método más adecuado depende del tipo de muestra, del nivel de precisión requerido y de la existencia o no de materiales de referencia.

El método utilizado en estudios farmacocinéticos es el de estándar interno debido a los sistemas de detección utilizados como el caso del MS/MS, a la matriz y a los procesos de preparación de muestra. El mismo consiste en agregar cantidades exactamente conocidas de una sustancia determinada (puede ser una molécula análoga o un isótopo dependiendo del sistema de detección) tanto a la muestra como a los diferentes niveles de la recta de calibración y controles de calidad (CC). Se calcula la relación de áreas de analito y estándar interno (EI) tanto en la muestra como en los estándares y en los CC. Con las relaciones de áreas de los estándares se realiza la recta de calibración y con la ecuación de la regresión lineal se puede calcular la concentración de analito en la muestra a partir de su relación de área.

Los parámetros fundamentales para validar una metodología bioanalítica satisfaciendo los requerimientos de las autoridades regulatorias nacionales (ANMAT, 2005) e internacionales (USFDA, 2001) son: sesgo o veracidad, precisión, selectividad, sensibilidad, linealidad, recuperación, efecto matriz y estabilidad del analito en la matriz (corto plazo, condiciones de análisis, congelado-descongelado y largo plazo).

1.3.4.1 Selectividad

La selectividad es la propiedad de un método analítico para diferenciar y cuantificar un analito específico en presencia de otros componentes de la muestra. Se deben analizar muestras "blanco" de matriz biológica (plasma, sangre, orina u otra matriz) obtenidas de por lo menos, seis fuentes distintas. Cada muestra blanco debe ser ensayada de interferentes y se debe asegurar la selectividad en el límite de cuantificación.

Para verificar las interferencias se debe trabajar con la adición de la solución patrón del analito a una concentración correspondiente con el límite inferior de cuantificación (LIC).

Cuando se utiliza plasma como matriz biológica, se recomienda que se ensayen cuatro plasmas normales, un plasma lipémico y un plasma hemolizado.

1.3.4.2 Veracidad

La veracidad o sesgo de un método analítico describe la proximidad de los resultados obtenidos por el método en estudio con relación a un valor verdadero. La exactitud se determina mediante el análisis repetido de muestras control de calidad (CC) que contienen cantidades conocidas del analito. Debe medirse un mínimo de cinco determinaciones por concentración. Se recomienda un mínimo de cuatro niveles de concentración en el rango lineal de la recta de calibración (LIC, bajo, medio y alto). El error relativo porcentual (Ecuación 16) entre el valor medio y el valor nominal debe ser $\leq 15\%$ para los diferentes niveles de concentración excepto en el LIC el cual debe ser $\leq 20\%$.

$$ER[\%] = \left| \frac{(\bar{C}_{\text{valor medido}} - C_{\text{valor nominal}})}{C_{\text{valor nominal}}} \times 100 \right| \quad \text{Ecuación 16}$$

1.3.4.3 Precisión

La precisión de un método analítico describe la proximidad entre las diferentes medidas individuales de un analito. Se debe determinar la precisión intra e interdía con un mínimo de cuatro concentraciones (LIC, bajo, medio y alto) por quintuplicado.

El coeficiente de variación porcentual (Ecuación 17) debe ser $\leq 15\%$ para los diferentes niveles de concentración excepto en el LIC el cual debe ser $\leq 20\%$.

$$CV[\%] = \frac{S_{ER} [ng/mL]}{C_{ER} [ng/mL]} \times 100 \quad \text{Ecuación 17}$$

1.3.4.4 Límite de cuantificación

Para los métodos bioanalíticos la respuesta del analito en el LIC debe ser por lo menos cinco veces mayor que la respuesta comparada con el blanco y debe cumplir con los criterios de veracidad y precisión demostrada experimentalmente con muestras de control de calidad preparadas a ese nivel de concentración.

1.3.4.5 Rango Lineal

Una recta de respuesta patrón es la relación entre la respuesta del instrumento y la concentración conocida de la droga. Se debe generar una recta de respuesta para cada analito de la muestra según Ecuación 18:

$$y = C_{ER \text{ Plasma}} b + a \quad \text{Ecuación 18}$$

donde y es la relación de área de los cromatogramas (A_{ER}/A_{EI}), a y b son la ordenada y la pendiente de la recta de calibración, respectivamente.

Una cantidad suficiente de muestras deben ser usadas para definir adecuadamente la relación entre concentración y respuesta. La recta de calibración con adición de estándar interno debe ser preparada en la misma matriz biológica que las muestras a analizarse, adicionando a la matriz concentraciones conocidas del analito. El rango de concentraciones utilizado para la construcción de la recta será función de los valores analíticos esperados en el estudio.

La recta de calibración debe consistir en un blanco (BPL: muestra procesada sin estándar de analito ni estándar interno), un blanco más con estándar interno y seis o más patrones de calibración de concentración conocida que cubran el rango de valores esperados incluido el límite de cuantificación.

El ER% respecto del valor nominal debe ser $\leq 15\%$ para los diferentes niveles de concentración excepto en el LIC el cual debe ser $\leq 20\%$.

El CV% debe ser $\leq 15\%$ para los diferentes niveles de concentración excepto en el LIC el cual debe ser $\leq 20\%$.

1.3.4.6 Recuperación

La recuperación de una droga desde una matriz biológica es la cantidad de droga obtenida después de los procesos de purificación/extracción. Los ensayos de recuperación deben ser llevados a cabo comparando los resultados analíticos de muestras

a las cuales se les agregó la droga de interés en tres niveles de concentración (baja, media y alta) y realizando el proceso de extracción (No extraído), contra soluciones patrón del analito fortificadas sobre blancos de plasma procesados (Extraído), representando éstas últimas, el 100% de recuperación. La recuperación indica la eficiencia de todos los procesos involucrados en el método analítico y debe ser tratada dentro de un límite de variabilidad, no necesita ser del 100%, pero la cantidad recuperada de droga y de EI debe ser consistente, precisa y reproducible.

1.3.4.7 Efecto de matriz normalizado (EMN)

El efecto de matriz es una alteración en la eficiencia de ionización debido a la co-elución de compuestos. Este cambio en la eficiencia de ionización generalmente se asume que se produce en la fuente de ionización. Los efectos de matriz causan aumento o supresión de la señal, lo que produce resultados sobre o subestimados respectivamente cuando la recta de calibración no se realiza en la misma matriz que la muestra a analizar.

EL EMN se realiza sobre fuentes de plasma normal, plasma lipémico y plasma hemolizado (procesadas como el BPL de la recta de calibrado) sobre las cuales, luego de realizado el proceso de extracción, se efectúa la fortificación con concentraciones conocidas de analito correspondiente a los niveles de concentración bajo y alto. Además, se realizan tres preparaciones de cada nivel bajo y alto en H₂O. El EMN se evalúa a través de la relación de las áreas medias de $\text{Área}_{ER}/\text{Área}_{EI}$.

Para cada muestra se debe obtener el efecto matriz normalizado según la Ecuación 19:

$$\text{EMN} = \frac{\text{Área}_{ER/EI \text{ plasma}}}{\text{Área}_{ER/EI \text{ H}_2\text{O}}} \quad \text{Ecuación 19}$$

El coeficiente de variación porcentual (Ecuación 17) debe ser $\leq 15\%$.

1.3.4.8 Estabilidad del analito en matriz

La estabilidad de la droga en la matriz biológica es función de las condiciones de almacenamiento, propiedades químicas de la droga, de la matriz y del material de acondicionamiento o contenedor de la muestra. Las condiciones experimentales de los ensayos de estabilidad deben reflejar las situaciones a ser encontradas durante el manejo, almacenamiento y análisis de las muestras. También debe evaluarse la estabilidad de las

soluciones patrón. Para todos los ensayos de estabilidad del analito en matriz el ER% respecto del valor nominal debe ser $\leq 15\%$ y el CV% debe ser ≤ 15 .

✓ Ciclos de congelado - descongelado

La estabilidad del analito debe ser determinada después de por lo menos tres ciclos de congelado-descongelado, en un mínimo de tres alícuotas por cada nivel de concentración (baja y alta). Se debe conservar durante 24 horas a la temperatura de almacenamiento pretendida y descongelada a temperatura ambiente. Una vez descongelado totalmente, las muestras se deben re-congelar por 12 ó 24 horas en las mismas condiciones. Los ciclos de congelado-descongelado deben ser repetidos tres veces y analizados en el tercer ciclo.

✓ Estabilidad a corto plazo

Tres muestras de concentraciones baja y alta deben ser descongeladas a temperatura ambiente, mantenidas a esa temperatura (basándose en el tiempo durante el cual las muestras a ser analizadas serán mantenidas a temperatura ambiente antes de ser procesadas) y luego analizadas.

✓ Condiciones de análisis

Se debe determinar la estabilidad de las muestras procesadas, incluyendo el tiempo de residencia en el automuestreador. Tres muestras de cada nivel de concentración (baja y alta) deben ser descongeladas a temperatura ambiente, procesadas y dejadas a la temperatura del automuestreador.

✓ Estabilidad a largo plazo

El tiempo de almacenamiento en el estudio de estabilidad a largo plazo debe exceder el tiempo de almacenamiento de las muestras del estudio de BE, teniendo en cuenta el tiempo de almacenamiento de la primera muestra hasta el momento del análisis de la última muestra.

La estabilidad a largo plazo debe ser determinada en un mínimo de tres alícuotas de cada nivel de concentración (baja, media y alta) bajo las mismas condiciones de almacenamiento que las muestras de estudio. Los resultados deben ser comparados con los valores nominales de concentración de los CC.

✓ Estabilidad de la solución patrón.

Se debe determinar que tanto el analito como el EI, disueltos en un sistema de solventes, son estables a factores como calor, humedad, luz y exposición al aire. La estabilidad de la solución patrón del analito y del EI debe ser ensayada por lo menos seis

horas a temperatura ambiente y durante el tiempo de almacenamiento en freezer o refrigerador.

En la Tabla 1.14 se resumen los parámetros evaluados durante la validación de una metodología bioanalítica por HPLC aplicable a estudios farmacocinéticos junto con los respectivos criterios de aceptación.

Tabla 1.14: Criterios de aceptación en validación de metodologías bioanalíticas.

Parámetro	Criterio de aceptación	
Selectividad	% Interferencia ≤ 20 en el área correspondiente a t_R del analito y ≤ 5 en el área correspondiente a t_R del EI en los BPL respecto del Nivel 1 de la recta de calibración.	
Veracidad y precisión (intra e inter día)	ER% y CV%	≤ 15 y ≤ 15
Linealidad	ER%, CV% y r	≤ 15 , ≤ 15 y $\geq 0,98$
LIC	ER% y CV%	≤ 20 y ≤ 20
Recuperación	CV%	≤ 15
Efecto Matriz	CV%	≤ 15
Estabilidad en matriz:		
✓ Pre-procesamiento,		
✓ En inyector automático,	ER% y CV%	≤ 15 y ≤ 15
✓ Congelado-descongelado		
✓ Largo plazo		

1.4 Hipótesis del trabajo de tesis

En secciones anteriores ha quedado reflejado el impacto que ha tenido el tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), donde se combinan 3 o 4 antirretrovirales (ARVs) simultáneamente, en el tratamiento y sobrevida de pacientes infectados con VIH, así como la importancia de los estudios clínicos de

bioequivalencia, que aseguren la eficacia y seguridad de estos ARVs de formulación compleja, y permitan el monitoreo terapéutico de pacientes.

En nuestro país existe la necesidad de disponibilidad de metodologías bioanalíticas sensibles y robustas para la detección del perfil farmacocinético de 3 o 4 ARVs de forma simultánea en plasma humano, lo cual es requerido por la industria farmacéutica a los fines de registrar estos medicamentos ante agencias regulatorias, previo a su utilización en el tratamiento de pacientes.

La hipótesis planteada en esta tesis apunta a la factibilidad de *desarrollar, validar e implementar en estudios clínicos de bioequivalencia* diferentes metodologías analíticas basadas en HPLC-UV y HPLC-MS/MS, que sean altamente sensibles y robustas, a fin de cuantificar con precisión y exactitud ARVs en plasma humano.

La concreción de este plan de tesis permitirá a la industria farmacéutica argentina ofrecer a los pacientes de VIH alternativas terapéuticas con eficacia y seguridad comprobada.

1.5 Objetivos generales del trabajo de tesis

Los objetivos generales propuestos para el presente plan de trabajo han sido:

- Desarrollar métodos analíticos para la cuantificación de ARVs en matrices biológicas complejas empleando HPLC-MS/MS y HPLC-UV.
- Validar estas metodologías analíticas para determinar ARVs en plasma humano aplicables a estudios de bioequivalencia y monitoreo terapéutico, de acuerdo a los requerimientos de agencias regulatorias.
- Transferir estos desarrollos tecnológicos implementando estas metodologías analíticas en estudios de Bioequivalencia de formulaciones de ARVs de industria nacional.
- Debido a que este trabajo se realizó en un laboratorio privado, un objetivo de la tesis ha sido la promover y fomentar la vinculación interinstitucional a los fines de la transferencia directa de conocimientos al sector socio-productivo.
- Difundir, científicamente mediante publicaciones internacionales con referato y presentaciones a congreso, la experiencia obtenida en el tema en estudio.

Los objetivos antes descriptos traen aparejados los siguientes objetivos específicos.

1.5.1 Objetivos específicos

- Adquirir experiencia en técnicas analíticas de última generación como lo es la cromatografía líquida de alta performance acoplada a espectrometría de masas basada en un sistema analizador de masas triple cuadrupolos (HPLC-MS/MS), profundizar conocimientos en cromatografía líquida con detección ultravioleta/visible (HPLC-UV).
- Desarrollar una técnica analítica de extracción/preconcentración para determinar ARVs tales como: Efavirenz, Nelfinavir, Abacavir y Lamivudina en plasma humano mediante HPLC-UV y HPLC-MS/MS.
- Desarrollar técnicas de procesamiento de muestras biológicas (sangre, plasma) y de ser posible acoplarlas en línea al sistema de detección.
- Combinar las herramientas analíticas y estadísticas necesarias para llevar a cabo estudios de bioequivalencia de fármacos.

2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA BIOANALÍTICA POR HPLC-UV PARA CUANTIFICAR EFAVIRENZ EN PLASMA HUMANO: ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA

2.1 Resumen

Se desarrolló y validó una metodología bioanalítica por HPLC-UV para cuantificar Efavirenz (EFV) en plasma humano de manera exacta y precisa. EFV y Nelfinavir Mesilato (NFV) utilizado como estándar interno fueron extraídos a partir de 400 μL de plasma humano por precipitación de proteínas con ACN. EL método fue validado cumpliendo los requerimientos de la ANMAT en el rango de 51 a 10.140 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en plasma y aplicado a un ensayo de biodisponibilidad comparada entre dos formulaciones de EFV 600 mg para evaluar su intercambiabilidad. La formulación de Prueba y el producto de referencia (Stocrin®, comprimidos, de Merck Sharp & Dohme) conteniendo la misma cantidad de principio activo fueron evaluados en dosis única de 600 mg en 24 voluntarios sanos. En cada período, las dosis fueron administradas luego de un ayuno de 10 horas siguiendo un diseño de dosis única, cruzado de dos vías, pareado y balanceado. El análisis de bioequivalencia se determinó por el cálculo del intervalo de confianza (IC) del 90% para los cocientes Prueba/Referencia de los parámetros farmacocinéticos $C_{\text{máx}}$, ABC_{0-t} y $\text{ABC}_{0-\infty}$ considerando la transformación logarítmica de los mismos. Los IC del 90% para la relación de $C_{\text{máx}}$ (0,50 – 0,64), ABC_{0-t} (0,71 – 0,83) y $\text{ABC}_{0-\infty}$ (0,73 – 0,95) de los productos Prueba y Referencia están fuera del rango 0,80 - 1,25 propuesto por autoridades nacionales (ANMAT) e internacionales (FDA, EMA). Se concluyó que las dos formulaciones de EFV “no” son bioequivalentes en su velocidad y extensión de absorción y, por lo tanto, “no” pueden ser usadas indistintamente.

2.2 Introducción

El EFV fue el primer antirretroviral aprobado por la FDA para administrarse una sola vez al día. En los primeros estudios sobre la monoterapia de corto plazo se observó una reducción considerable del ARN vírico plasmático, pero este medicamento se utiliza en combinación con otros fármacos. En el 70% de un grupo de pacientes no tratados antes con antirretrovirales que recibieron EFV, Zidovudina y Lamivudina, el ARN plasmático del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) fue indetectable, en comparación con el 48% de otros que recibieron Indinavir, Zidovudina y Lamivudina (Flexner, 2007).

EFV también se ha utilizado con éxito cuando han fracasado otros antirretrovíricos. En un estudio de pacientes pediátricos con VIH, el 60% de aquellos en quienes antes fracasó el tratamiento con un inhibidor de la transcriptasa inversa mostraron beneficios virológicos sostenidos después de 48 semanas de tratamiento con EFV, Nelfinavir y un análogo de un nucleósido. El EFV se utiliza ampliamente en los países desarrollados, por su facilidad de administración, eficacia y tolerancia a largo plazo (Flexner, 2007).

Muchos métodos analíticos para el análisis de EFV solo o en combinación con otras drogas en plasma o suero han sido publicados usando cromatografía de fase reversa, LC/MS/MS (Bedor y col., 2011), HPLC-UV (Ramachandran y col., 2006) y HPLC con detector de fluorescencia (Matthews y col., 2002). Los volúmenes de muestra comúnmente reportados para este tipo de análisis varían entre 100 y 900 μ L (Lakshmi Sailaja y col., 2007; Mogatle y Kanfer, 2009). Entre las técnicas de extracción de EFV en plasma reportadas se incluye diversos métodos de extracción líquido-líquido (Takahashi y col., 2005), extracción en fase sólida (D'Arrigo, Migliardi, Santoro, & Spina, 2006) y precipitación de proteínas (Mogatle y Kanfer, 2009).

2.2.1 Aspectos farmacológicos y farmacocinéticos

EFV es un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo a los nucleósidos/nucleótidos (ITRNN) del virus humano de inmunodeficiencia adquirida tipo 1 (VIH-1). Interacciona con la transcriptasa reversa del VIH-1 en un sitio de unión hidrofóbico de la región de la unidad p66 de la transcriptasa reversa. Por dicha interacción, se produce un cambio en la orientación de las cadenas laterales conservadas, necesarias para la actividad catalítica de la enzima. A consecuencia, se inhibe el proceso de polimerización del ADN dependiente de ARN. La actividad de

EFV no compite con nucleósidos trifosfatos, transcriptasa reversa tipo 2 (VIH-2), o bien, polimerasas de eucariotas (por ej. ADN-polimerasas α , β , γ o δ). El EFV es el ITRNN más potente de su clase, con una concentración inhibitoria del 90 - 95% para líneas celulares virales VIH-1 aisladas y del tipo salvaje. EFV presenta una actividad antirretroviral contra la mayor parte de los subtipos A, AE, AG, C, D, F, G, J y N, pero presenta actividad reducida contra virus grupo O. Además, EFV muestra actividad antiviral aditiva in vitro al ser combinado con Delavirdina y Nevirapina, inhibidores de transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (Abacavir, Lamivudina, Estavudina), o bien inhibidores de proteasas (Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Saquinavir) (Flexner, 2007).

La biodisponibilidad oral de EFV es buena (45-66%). Luego de la administración de dosis entre 100 y 1600 mg de EFV a voluntarios sanos no infectados, las concentraciones plasmáticas máximas ($C_{m\acute{a}x}$) rondan entre 1,6 y 9,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. La $C_{m\acute{a}x}$ se alcanza aproximadamente entre las 3 y 5 horas ($T_{m\acute{a}x}$) y el estado estacionario se alcanza luego de 6 a 10 días de administración. Si bien existe un incremento en la exposición a la droga (medido como $C_{m\acute{a}x}$ y ABC), luego de administrar dosis entre 100 - 1600 mg, los incrementos no resultan proporcionales, lo cual sugiere que la absorción disminuye al aumentar la dosis del medicamento. La administración conjunta de EFV (comprimidos), junto a comidas altamente calóricas/lipídicas, incrementa un 28% el ABC y un 79% la $C_{m\acute{a}x}$, respecto al ayuno (Maggiolo, 2007, 2009).

Su metabolismo es auto-inducido, lo que lleva a una disminución del ABC en las primeras semanas de tratamiento (Maggiolo, 2007, 2009). Esto se observa al comparar la vida media de eliminación, la cual luego de una dosis única es de 52 - 76 horas, mientras que luego de dosis múltiples es de 40 - 55 horas. Menos del 1% de la dosis administrada de EFV se excreta en orina como droga inalterada, el resto son metabolitos. Lo contrario ocurre con la eliminación en heces. EFV se metaboliza principalmente vía citocromo P450, con la formación de metabolitos hidroxilados los que a su vez, son glucuronizados y excretados. Dichos metabolitos, son inactivos farmacológicamente. Las principales isoenzimas relacionadas con el metabolismo de EFV son CYP3A4 y CYP2B6 (Flexner, 2007).

2.3 Objetivo

- ✓ Desarrollar y validar la metodología analítica para determinar EFV por HPLC-UV en plasma humano a niveles de concentración de 50 a 10.000 ng.mL^{-1} .

- ✓ Aplicar la metodología validada a un estudio de biodisponibilidad comparativa de EFV de un producto farmacéutico de origen nacional.
- ✓ Analizar la farmacocinética comparada de dos formulaciones que contienen EFV en comprimidos recubiertos de 600 mg, bajo un diseño de dosis única, cruzado de dos vías, pareado y balanceado, por comparación entre la administración de 600 mg contenidos en 1 comprimido recubierto de la “Formulación de Prueba” comprimidos recubiertos 600 mg, respecto de 1 comprimido recubierto de 600 mg de la “Formulación de Referencia” Stocrin®, de Merck Sharp & Dohme.

2.4 Experimental

Para el desarrollo y validación de la metodología bioanalítica se utilizó el equipamiento cuyas características se describen en la Tabla 2.1, los reactivos y estándares presentados en la Tabla 2.2 y Tabla 2.3, respectivamente.

Tabla 2.1: Equipamiento y materiales generales.

Componente	Marca	Modelo
Cromatógrafo líquido	Waters	1525
Inyector automático	Waters	717plus
Detector UV	Waters	2487
Columna cromatográfica	Phenomenex	Gemini, 150 × 4,6 mm, 5 µm.
Vortex	Boeco	V1 Plus
Centrífuga	Eppendorf	5702R
Micropipetas automáticas	Gilson	P20; P200 y P1000

Tabla 2.2: Estándares analíticos.

Estándar	Propósito	Calidad	Pureza	Lote
EFV	Analito a cuantificar	Primario-USP®	99,7 %	FOG376
Nelfinavir Mesilato	EI	Primario-USP®	98,3 %	FOK050

Tabla 2.3: Reactivos.

Componente	Marca	Lote
ACN - grado HPLC	Carlo Erba	D5M0060095M
H ₂ O - grado HPLC	Carlo Erba	V5A403225A
MeOH - grado HPLC	Pharmco Aaper	C15613006
Fosfato de Potasio	Cicarelli	66846

Para los ensayos de especificidad, linealidad, controles de calidad, recuperación y preparación de controles de calidad se utilizaron muestras blanco de plasma humano de 20 individuos (material biológico) tal como se indica en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Material biológico.

Componente	Fuente	Lote
Plasma Humano Normal	Dominguezlab	PL-Normal-SDF-P1-7
Plasma Humano Lipémico	Dominguezlab	PL-Lipémico-SDF-P1-2
Plasma Humano Hemolizado	Dominguezlab	PL-Hemolizado-SDF-P1-2

2.4.1 Metodología de trabajo

En lo que respecta a la parte analítica se desarrolló y validó una metodología bioanalítica para cuantificar EFV en el rango de 50 a 10.000 ng.mL⁻¹ en plasma humano. Con la finalidad de resolver los picos cromatográficos tanto de EFV como del EI, así como también disponer de un tiempo de corrida apropiado para analizar con veracidad y precisión aproximadamente 200 muestras en cada secuencia cromatográfica, en el desarrollo de la metodología bioanalítica se tuvieron en cuenta las siguientes variables:

- ✓ composición y flujo de la fase móvil: se evaluó la retención de los analitos y el tiempo de corrida con composición de fase orgánica desde 50% hasta 90% y flujos en el rango de 0,80 a 1,50 ml.min⁻¹.
- ✓ características de la columna cromatográfica: se evaluaron tamaños de partícula de 3,5 y 5 µm en columnas C₁₈.
- ✓ longitud de onda del detector: se realizó un barrido espectral para determinar la longitud de onda de trabajo.
- ✓ relación de solventes en el vial de HPLC: inyección directa del sobrenadante, dilución 1:1 y 1:3 con agua ultrapura grado HPLC luego de la precipitación de proteínas.
- ✓ volumen de inyección: se inyectaron volúmenes desde 20 a 100 µL.

La optimización se realizó variando un parámetro instrumental a la vez. El procesamiento de muestras empleado fue el más sencillo posible de manera de poder permitir alcanzar el límite de cuantificación deseado así como también procesar

múltiples muestras en una misma secuencia analítica. Este desarrollo y validación bioanalítica tiende a satisfacer los requerimientos de la autoridad regulatoria nacional (ANMAT). La metodología validada se aplicó al análisis de las muestras plasmáticas de los voluntarios y fue monitoreado sistemáticamente dentro de cada secuencia analítica para garantizar la calidad de los resultados obtenidos.

En cuanto al estudio clínico, la metodología de trabajo se basó en proponer el diseño óptimo, el adecuado número de voluntarios y el correcto muestreo con el objeto de poder describir la curva farmacocinética de EFV en plasma humano, así como también, demostrar la intercambiabilidad de las 2 formulaciones evaluadas. EL protocolo del estudio de bioequivalencia código “PRO-BEQ-EFV-001-V.02” contó con la aprobación de la autoridad sanitaria nacional (ANMAT).

A partir de la cuantificación plasmática de EFV a los distintos tiempos de muestreo, se calcularon los parámetros farmacocinéticos de acuerdo a las disposiciones N° 3185/99, 5040/06 y 1746/07 de ANMAT, por un método no compartimental utilizando el programa WinNonlin Professional v.6.02 (Pharsight, Mountain View, CA). Los parámetros calculados fueron: ABC_{0-t} ; $ABC_{0-\infty}$; $C_{m\acute{a}x}$; $T_{m\acute{a}x}$; k_{el} y $T_{1/2\ elim}$.

Los resultados farmacocinéticos descriptivos fueron expresados como la media (\pm desviación estándar) y media geométrica. Se presentaron los resultados individuales de cada voluntario para cada formulación, así como también los promedios para cada formulación.

Se calcularon los cocientes de los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ para evaluar la bioequivalencia, considerando un intervalo de confianza de 90% a través de la Prueba *t*. El análisis de la variancia se utilizó para evaluar factores de secuencia, período y tratamiento, considerando la determinación de la menor diferencia significativa ($p < 0,05$).

2.4.2 Formulaciones en estudio

La formulación en estudio, producto de industria nacional, así como también la formulación de referencia (Stocrin[®], Merck Sharp & Dohme, Australia) se presentan en forma de comprimidos recubiertos que contienen 600 mg de EFV.

2.4.3 Diseño del estudio

El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Clínica de DominguezLab S.R.L, de la ciudad de Paraná, provincia de Entre Ríos, Argentina. El mismo fue conducido por personal entrenado en normas de buenas prácticas clínicas (ANMAT, 2010) de acuerdo a la Conferencia Internacional de Armonización (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996), declaración de Helsinski (AMM, 2013) y las Disposiciones N° 3311/2001, 5040/06, 1746/07, 6677/10 de ANMAT.

El estudio clínico contó con la aprobación del Comité de Ética en Investigación Institucional de DominguezLab S.R.L (CEIID), el cual responde a las normativas internacionales y con el consentimiento informado firmado por los voluntarios para su participación en el protocolo y comienzo del estudio. La ANMAT fue informada sobre la intención y comienzo del estudio, así como también de su finalización.

La investigación consistió en un estudio abierto, aleatorizado, cruzado, con dos períodos y dos secuencias tal como se detalla en la Ilustración 1-F. Los voluntarios recibieron en cada período la formulación de estudio de EFV 600 mg o la formulación de referencia de Stocrin[®] de Merck Sharp & Dohme, resultando en dos secuencias. Se seleccionaron 24 voluntarios masculinos sanos de acuerdo a la fórmula propuesta por Marzo y Balant (1995) y datos previos reportados en literatura (Maggiolo, 2009; Martindale y Kathleen, 2009). Los voluntarios que participaron reunieron todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión según protocolo “PRO-BEQ-EFV-001-V.02” propiedad intelectual de Dominguelab S.R.L. El período de tiempo entre las dos internaciones obedeció a un intervalo mínimo de 5 a 7 vidas medias de la droga en estudio, período conocido como de lavado o *wash out*. Debido a que EFV presenta un $t_{1/2} = 52 - 76$ horas (Martindale y Kathleen, 2009), se planificó un intervalo de por lo menos 28 días entre los dos períodos.

2.4.4 Extracción, manejo y almacenamiento de las muestras biológicas

Se extrajeron aproximadamente 4 mL de sangre venosa a los siguientes tiempos: 0 pre-dosis; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48, 96, 144 y 192 horas post-dosis considerando como tiempo cero el momento de la administración de la formulación. Entre cada toma de muestra, la sonda se lavó con heparina líquida (5 UI/mL) y luego, con solución fisiológica, la cual se descartó al final de cada extracción. Luego se centrifugó a 1500 g, durante cinco minutos y una vez separado el plasma con micropipetas, se dispuso en dos

crioviales de polipropileno de 2 mL (muestra y contramuestra) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

2.5 Resultados y Discusión

2.5.1 Desarrollo de la metodología bioanalítica

Para el desarrollo de esta metodología bioanalítica se tuvieron en cuenta principalmente 2 factores; el rango lineal y el tiempo de la corrida cromatográfica de manera de poder aplicar el método a un estudio de bioequivalencia.

Se realizó un barrido espectral determinándose que la mejor longitud de onda para llegar a la sensibilidad necesaria fue 250 nm. Respecto de la cromatografía y de acuerdo a las características químicas de EFV, se desarrolló un método de fase reversa utilizando columnas C_{18} y como solventes de elución MeOH, ACN y buffer fosfato, pH 3,3. La relación de solventes de la fase móvil fue optimizada de manera de poder resolver el EFV del NFV utilizado como EI sumado a la necesidad de que los componentes de la matriz no afecten la especificidad, así como tampoco el rango lineal. EL flujo de la fase móvil se varió en el rango de 0,80 a 1,50 mL.min⁻¹ teniendo en cuenta las características de las partículas de la columna cromatográfica utilizada. Flujos de 0,80 mL.min⁻¹ produjeron picos anchos y tiempos de corrida mayores a 15 minutos y flujos de 1,50 mL.min⁻¹ no proporcionaron el tiempo suficiente para tener una adecuada interacción cromatográfica entre los analitos y la columna. Respecto a la preparación de las muestras se trabajó con el objeto de que sea sencilla, rápida y económica. Se prestó atención al tipo de solvente utilizado para precipitar las proteínas (MeOH y ACN) así como también al volumen utilizado de manera de no diluir significativamente la muestra, pero asegurando siempre la mayor separación de proteínas para evitar que estas precipiten dentro de la columna cromatográfica. También se optimizó la dilución en el vial de HPLC con el objeto de tener una adecuada relación fase acuosa/fase orgánica que no afecte a la forma del pico y asegurando llegar al límite de cuantificación deseado. Las condiciones cromatográficas que permitieron cumplir los objetivos planteados se presentan en la Tabla 2.5 y la metodología bioanalítica se encuentra detallada en el documento T-009-TEC-15-V03, propiedad intelectual de DominguezLab S.R.L.

La preparación de la recta de calibración y de las muestras fue la siguiente: 400 µL de plasma humano se fortificaron con 100 µL EI de Nelfinavir Mesilato y/o EFV estándar de referencia. Posteriormente, se adicionó un volumen de ACN según Tabla 2.6,

se aplicó agitación en un vortex durante 30 s y se centrifugó durante 5 min a 3000 g, logrando la precipitación de proteínas. Finalmente, el sobrenadante se diluyó 1:1 con H₂O HPLC en un vial (500 µL de sobrenadante y 500 µL de H₂O) y se inyectó en el cromatógrafo. Las muestras se procesaron como el nivel 0 de la recta de calibración, el cual no contiene EFV, pero sí EI.

Se utilizó Nelfinavir Mesilato como EI ya que por las características del sistema de detección fue necesario un compuesto que se diferencie químicamente del analito y presente un desempeño cromatográfico (k') similar al analitos en estudio. EL objetivo de esta metodología fue aplicarla específicamente a un estudio de farmacocinética comparada de formulaciones conteniendo EFV, de querer utilizarse para monitoreo terapéutico de EFV en pacientes bajo TARGA se debe procesar un blanco de plasma con el objeto de confirmar la ausencia de Nelfinavir ya que el mismo se utilizó como EI además de evaluar la posible interferencia de otros compuestos ya que en el ensayo de especificidad no se evaluó la resolución cromatográfica de otros ARVs que no sean EFV y NFV.

Tabla 2.5: Condiciones cromatográficas T-009-TEC-15-V03.

Parámetro	Descripción
Fase móvil	Buffer fosfato 50 mM pH 3,3: ACN: MeOH (40:46:14).
Flujo	1,2 mL.min ⁻¹
Columna analítica	Gemini, Phenomenex, 150 × 4,6 mm, 5 µm
Temperatura de columna	35 °C
Temperatura del inyector	15 °C
Volumen de inyección	80 µL
Longitud de onda	250 nm
Tiempo de corrida	11 min
Tiempo de retención	EFV 7,5 min
	Nelfinavir 5,0 min

2.5.2 Resultados de la validación del método analítico

Los parámetros evaluados en la validación de la metodología bioanalítica fueron: efecto arrastre entre corridas, selectividad; linealidad, veracidad y precisión intra e inter-día, recuperación, estabilidad del analito en matriz (plasma). A continuación, se detallan los resultados de cada uno de los parámetros evaluados.

2.5.2.1 Especificidad

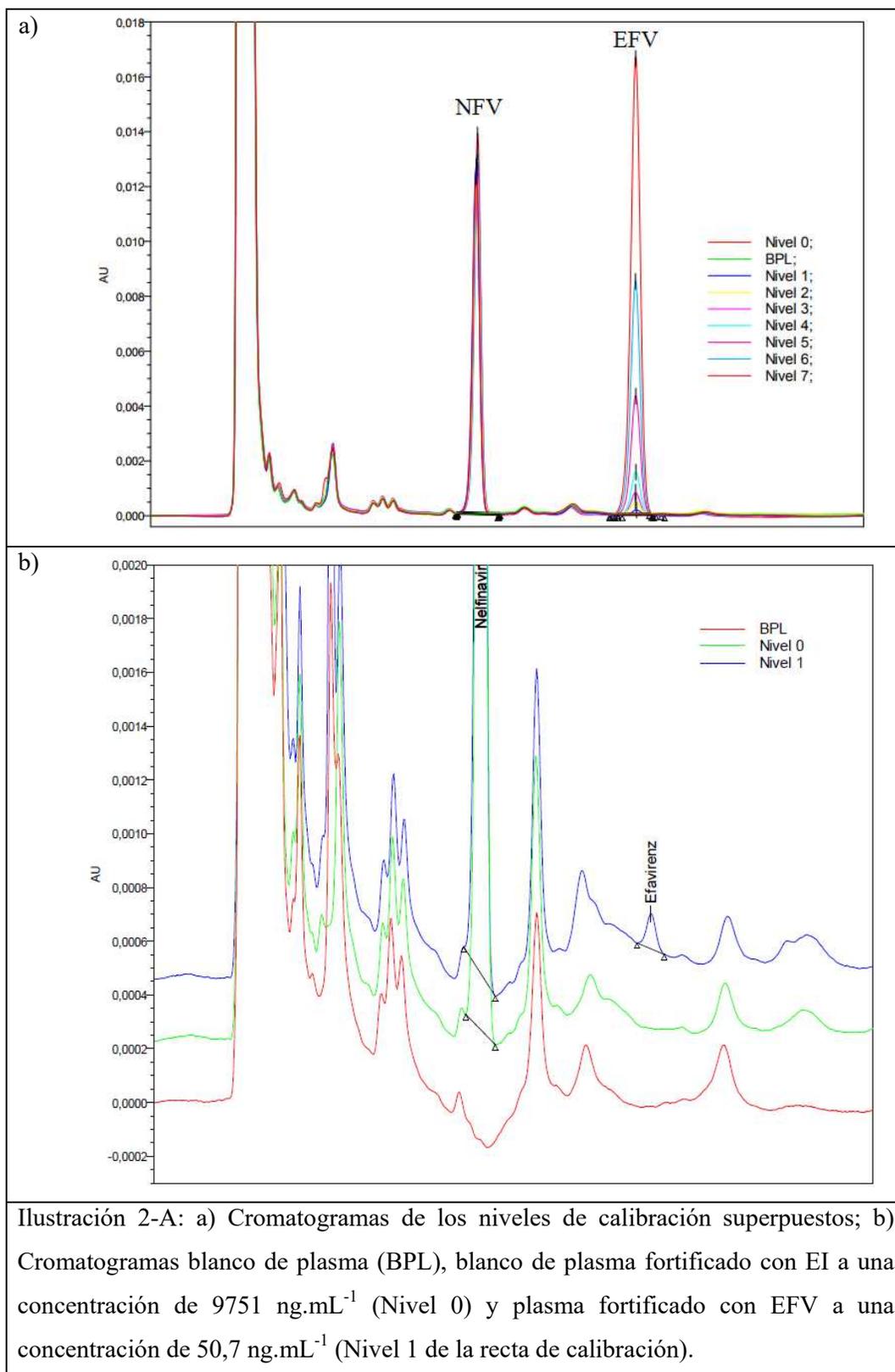


Ilustración 2-A: a) Cromatogramas de los niveles de calibración superpuestos; b) Cromatogramas blanco de plasma (BPL), blanco de plasma fortificado con EI a una concentración de 9751 ng.mL⁻¹ (Nivel 0) y plasma fortificado con EFV a una concentración de 50,7 ng.mL⁻¹ (Nivel 1 de la recta de calibración).

Cada muestra blanco, descrita en la Tabla 2.4, se ensayó para determinar la interferencia usando el procedimiento de extracción y detección propuesto. Se compararon las respuestas de los cromatogramas blanco con las obtenidas en plasma fortificado con EFV y EI. No se encontraron interferencias significativas en el tiempo de retención del fármaco o EI, tal como se observa en los cromatogramas presentados en la Ilustración 2-A.

2.5.2.2 Rango lineal

La recta de calibración se efectuó sobre blanco de plasma fortificado con soluciones de trabajo de EFV y EI cubriendo el rango esperado de concentraciones a cuantificar tal como se indica en la Tabla 2.6, la cual consistió de:

- i) una muestra blanco (matriz procesada sin EFV ni EI);
- ii) una muestra cero (matriz procesada sin EFV y con EI);
- iii) nueve muestras no cero, cubriendo el rango de concentraciones a cuantificar (matriz procesada con EFV y con EI).

Tabla 2.6: Datos analíticos de la recta de calibración de EFV en plasma humano.

Nivel	$C_{\text{EFV en Plasma}}$ [ng.mL ⁻¹]	V_{plasma} [μL]	$V_{\text{ST-EFV}}$ [μL]	V_{ACN} [μL]	V_{EI} [μL]	$C_{\text{EI en Plasma}}$ [ng.mL ⁻¹]
BPL	0	400	0	800	0	9751
Nivel 0	0	400	0	700	100	9751
Nivel 1	50,7	400	20 ^[2]	680	100	9751
Nivel 2	127	400	50 ^[2]	650	100	9751
Nivel 3	253	400	100 ^[2]	600	100	9751
Nivel 4	507	400	200 ^[2]	500	100	9751
Nivel 5	1267	400	50 ^[1]	650	100	9751
Nivel 6	2535	400	100 ^[1]	600	100	9751
Nivel 7	5070	400	200 ^[1]	500	100	9751
Nivel 8	7605	400	300 ^[1]	400	100	9751
Nivel 9	10140	400	400 ^[1]	300	100	9751

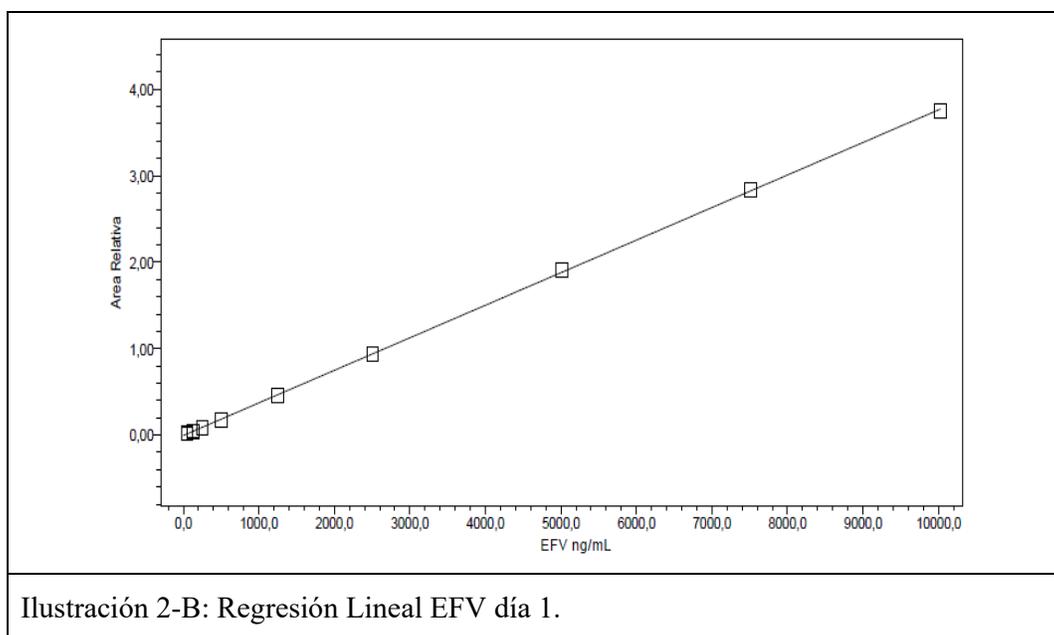
Observaciones: [2] ST2 de EFV 1,014 μg.mL⁻¹; [1] ST1 de EFV de 10,14 μg.mL⁻¹; ST1 de EI de 39,01 μg.mL⁻¹. Todas las soluciones de trabajo se prepararon en ACN de manera que todos los niveles tengan la misma proporción de ACN.

La relación de las áreas de EFV y EI en los estándares de calibración fueron proporcionales a la concentración de EFV en plasma humano en el rango 50,7 – 10.139,7 ng.mL⁻¹.

Las ecuaciones de las rectas de calibración se obtuvieron mediante regresión lineal por mínimos cuadrados con coeficientes de correlación mayores a 0,99. Los resultados de la linealidad del método se presentan en la Tabla 2.7 e Ilustración 2-B.

Tabla 2.7: Regresiones lineales EFV en plasma humano.

Nivel	C _{EFV Plasma} (ng.mL ⁻¹)	% Veracidad (CV%)			Cumple (Si/No)
		Día 1	Día 2	Día 3	
BPL	0	NA	NA	NA	Si
Nivel 0	0	NA	NA	NA	Si
Nivel 1	50,7	111,8 (3,9)	112,7 (3,3)	117,8 (1,6)	Si
Nivel 2	127	99,0 (2,5)	98,3 (0,8)	98,5 (0,5)	Si
Nivel 3	253	101,0 (1,9)	91,7 (1,2)	96,6 (0,7)	Si
Nivel 4	507	103,7 (0,5)	96,8 (3,6)	99,6 (1,3)	Si
Nivel 5	1.267	99,7 (1,1)	102,5 (0,9)	98,7 (0,6)	Si
Nivel 6	2.535	100,1 (0,4)	100,9 (1,1)	100,7 (0,5)	Si
Nivel 7	5.070	99,0 (0,2)	99,5 (0,5)	100,2 (0,9)	Si
Nivel 8	7.605	100,7 (0,4)	100,3 (1,4)	99,8 (0,9)	Si
Nivel 9	10.140	100,2 (0,8)	100,0 (1,7)	99,9 (0,7)	Si
Regresión lineal		y = 0,00037 x - 0,0025	y = 0,00035 x - 0,0052	y = 0,00036 x - 0,0032	Si
Coefficiente de correlación (r)		0,999953	0,999862	0,999967	



2.5.2.3 Precisión y veracidad Intra e Inter día

Se prepararon controles de calidad (CC) en cuatro niveles: bajo, medio, alto y dilución para evaluar la veracidad, precisión y estabilidad de las muestras durante el análisis. Los CC se prepararon fortificando volúmenes adecuados de matriz blanco con un volumen adecuado de SM y ST de EFV. Se homogeneizaron y se tomaron alícuotas de 400 μL en crioviales, las cuales se almacenaron en las mismas condiciones a las cuales se almacenan las muestras biológicas hasta que el ensayo lo requiera. Las concentraciones de cada uno de ellos se indican en la Tabla 2.8

Tabla 2.8: Preparación de controles de calidad de EFV.

Nivel	V _{Plasma} [μL]	V _{SM-EFV} [μL]	V _{ST2-EFV} [μL]	C _{EFV} [$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$]
CC Bajo	9.500	-	500	50,7
CC Medio	9.825	75	-	3.802,4
CC Alto	9.800	200	-	10.139,7
CC Dilución	4.850	150	-	15.209,5

Observaciones: ST2 de EFV 1,014 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; SM de EFV de 506,98 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

En la Tabla 2.9 se observa que la precisión y veracidad intra-día estuvo en el rango de 1,2 - 4,7% y 88,0 - 109,8% respectivamente, como es de esperar la mayor variabilidad se presentó en el LIC. La precisión y veracidad inter-día estuvo en el rango de 2,3 - 6,9% y 99,5 - 100,1% respecto de la concentración nominal de cada control de calidad.

Tabla 2.9: Precisión y veracidad Intra e Inter día.

Parámetro	CC LIC			CC Medio			CC Alto		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
% Veracidad Intra-día	96,1	104,1	102,7	100,1	99,3	101,6	97,0	99,9	101,0
	88,0	102,6	97,7	99,4	102,9	100,8	99,3	101,5	100,5
	92,9	94,3	101,6	97,2	104,4	99,1	96,6	100,8	98,3
	98,2	106,1	107,9	98,7	103,7	-	96,4	98,5	102,1
	94,0	101,9	109,8	97,3	98,0	99,3	93,5	103,9	103,5
Intra-día (CV%)	4,1	4,4	4,7	1,3	2,8	1,2	2,2	2,0	1,9
% Veracidad Inter-día	99,9			100,1			99,5		
Precisión Inter-día	6,1			2,3			2,9		

2.5.2.4 Recuperación

La recuperación se evaluó a través de la relación de las concentraciones medias de plasmas fortificados luego del proceso de precipitación ($\bar{C}_{ER\text{Plasma}}$ pos precipitado) a plasmas fortificados antes de realizar el proceso de precipitación de proteínas ($\bar{C}_{ER\text{Plasma}}$ precipitado). Los resultados se presentan en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10: Resultados ensayo de recuperación EFV en plasma humano.

Nivel	$\bar{C}_{ER\text{Plasma}}$ pos precipitado (ng.mL ⁻¹)	CV %	$\bar{C}_{ER\text{Plasma}}$ precipitado (ng.mL ⁻¹)	CV %	$\bar{R}\%$	Cumple (Si/No)
Plasma normal						
Bajo	126,2	3,3	115,4	2,3	109,3	Si
Medio	2413,4	1,6	2328,7	0,5	103,6	Si
Alto	9578,6	0,9	9410,4	1,2	101,8	Si
Plasma Lipémico						
Bajo	126,1	0,6	119,1	0,5	105,9	Si
Medio	2432,3	0,5	2356,4	1,0	103,2	Si
Alto	9514,2	0,4	9609,3	0,5	99,0	Si
Plasma Hemolizado						
Bajo	126,3	0,9	118,4	0,7	106,7	Si
Medio	2442,0	0,5	2353,8	0,2	103,7	Si
Alto	9598,9	0,8	9675,5	0,3	99,2	Si

Los porcentajes de recuperación promedio ($\bar{R}\%$) estuvieron próximos a 100%.

2.5.2.5 Estabilidad en matriz

La estabilidad de EFV en plasma humano bajo diferentes condiciones se muestra en la Tabla 2.11, con concentraciones detectables luego de cada condición de al menos el 93.0% de su concentración nominal. La estabilidad en matriz se evalúa sobre EFV ya que la muestra almacenada solamente tiene ese analito. El EI se adiciona en el momento de procesamiento. Si bien en el inyector automático están presentes tanto el analito como el EI, la estabilidad de éste último está contemplada indirectamente en los valores de veracidad que proporcionan los controles de calidad utilizados para evaluar las diferentes condiciones de estabilidad en matriz ya que el objetivo es cuantificar EFV con veracidad y precisión.

Tabla 2.11: Estabilidad en matriz.

Condición de estabilidad de EFV en matriz	% Veracidad (CV%)		
	CC Bajo	CC Medio	CC Alto
En mesada durante 6 hs	106,0 (1,2)	99,1 (0,6)	94,4 (0,5)
En inyector automático durante 24 hs	105,6 (5,6)	101,7 (3,6)	100,6 (0,6)
Luego de 3 ciclos de congelado – descongelado	97,1 (2,9)	102,2 (4,5)	107,1 (7,1)
En freezer a -20 °C durante 154 días	93,0 (7,0)	104,7 (4,7)	101,8 (1,8)

2.5.2.6 Cifras analíticas de mérito

En la Tabla 2.12 se resumen las cifras analíticas de mérito, las cuales cumplen con las exigencias de la autoridad sanitaria nacional (ANMAT, 2005) y con las recomendaciones de las guías internacionales de validación de métodos bioanalíticos (USFDA, 2001). En términos generales los valores recomendados para linealidad, veracidad y precisión intra e inter día son:

Tabla 2.12: Resumen de cifras analíticas de mérito para cuantificar EFV en plasma humano por HPLC-UV.

Parámetro	Valor obtenido	Cumple Si/No
Ausencia de interferencia en los tr de EFV		
Selectividad	y NFV	Si
Veracidad y precisión intra-día	ER% < 12,0; CV% < 4,7	Si
Veracidad y precisión inter-día	ER% < 0,5; CV% < 6,1	Si
Linealidad *	Día 1	ER% < 11,8; CV% < 3,9
	Día 2	ER% < 12,7; CV% < 3,6
	Día 3	ER% < 17,8; CV% < 1,6
Recuperación	ER% < 9,3; CV% < 2,3	Si
Estabilidad en matriz:		
✓ Pre-procesamiento,	ER% < 6,0; CV% < 1,2	Si
✓ En inyector automático,	ER% < 5,6; CV% < 5,6	Si
✓ Congelado-descongelado y	ER% < 7,1; CV% < 7,1	Si
✓ Largo plazo	ER% < 7,0; CV% < 7,0	Si

*: Los valores de ER% corresponden al LIC ya que es el nivel que presenta mayor ER% (ver Tabla 2.7).

2.5.3 Comparación de metodologías analíticas

La validación cumplió con las exigencias de la ANMAT. Tal como se observa en la Tabla 2.13 existen diversas metodologías por HPLC-UV para cuantificar EFV en plasma humano, las cuales se diferencian en cuanto al volumen de muestra, método de extracción, rango lineal y tiempo de corrida, utilizando extracción líquido-líquido o SPE para poder llegar al límite de cuantificación necesario. Si bien la metodología propuesta por Mogatle y Kanfer (2009) utiliza precipitación de proteínas, su límite de cuantificación es 4 veces superior a nuestro desarrollo. Esto limita el tiempo máximo de muestreo para determinar EFV en plasma humano con exactitud y precisión, lo cual incide en el diseño del muestreo utilizado para describir su farmacocinética. A excepción de la metodología propuesta por (Lakshmi Sailaja y col., 2007) las demás no presentan un problema respecto del volumen de muestra ya que en promedio se obtienen 2,0 mL de plasma por cada tiempo muestreado lo cual es suficiente para un análisis, reanálisis y contra muestra. La decisión de llevar el tiempo de corrida a 11 minutos estuvo relacionada a la cantidad de muestras a ser analizadas en una misma secuencia

cromatográfica y asegurarnos que todas tengan la misma condición de partida en cuanto a la línea de base luego de 100 o 200 inyecciones.

Tabla 2.13: Metodologías por HPLC-UV para cuantificar EFV en plasma humano.

Plasma (μL)	Ext.	Rango lineal ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Veracidad y Precisión (% - CV%)	%R	Corrida (min)	Referencia
500	L-L	0,05-12,17	101 - < 6,5	93	30	(Takahashi y col., 2005)
300	SPE	0,10-10,00	105 - < 8,6	82	12	(D'Arrigo y col., 2006)
250	L-L	0,06-10,00	93 - < 6,8	101	10	(Ramachandran y col., 2006)
900	L-L	0,10-10,00	98 - < 8,6	80	8	(Lakshmi y col., 2007)
100	PP	0,20-10,00	103 - < 7,2	93	10	(Mogatle y Kanfer, 2009)
300	SPE	0,10-20,00	101 - < 4,2	>70	10	(Fox y col., 2011)
500	SPE	0,15-15,00	100 - < 8,8	>80	25	(Charbe y col., 2016)
400	PP	0,05-10,14	100 - < 6,1	104	11	*

Ext.: Extracción; L-L: extracción Líquido-Líquido; %R: Porcentaje de recuperación; *: metodología validada en la Tesis.

2.5.4 Resultados del estudio clínico

La investigación consistió en un estudio abierto de dosis única de 600 mg de EFV (1 comprimido), en 24 voluntarios sanos, aleatorizado, cruzado, pareado, balanceado, realizado en dos períodos y dos secuencias, con un período de lavado de 28 días entre cada período.

Los voluntarios concurren a las 22.00 horas del día anterior a recibir la formulación, a la Unidad de Investigación Clínica – DominguezLab, donde fueron internados, habiendo ingerido una cena estandarizada. Los voluntarios estuvieron con un ayuno de 10 horas de alimentos sólidos, pudiendo consumir toda el agua que deseen excepto una hora antes de la administración de la formulación a ensayar. Al día siguiente, se colocó un dispositivo intravenoso, tipo Abbocath, en el antebrazo y se extrajeron aproximadamente 4 mL de sangre en los tiempos estipulados en el Protocolo.

Antes del comienzo de las extracciones y luego de las extracciones de las horas 2, 6, 12 y 24 horas se midió la presión arterial y la frecuencia cardíaca de los voluntarios; también se interrogó al voluntario por su estado general y sobre los posibles eventos adversos.

De acuerdo a su número de aleatorización los voluntarios recibieron una dosis única de 1 comprimido de la formulación de Referencia (Stocrin®, comprimidos recubiertos de 600 mg, de Merck Sharp & Dohme) o de la formulación de Estudio (Efavirenz comprimidos recubiertos de 600 mg) con 240 mL de agua.

Los voluntarios permanecieron internados en el centro (al menos 22 horas de internación) y se les proporcionó bebida y alimentación perfectamente estandarizada.

El estudio fue completado por los 24 voluntarios cuyos datos antropométricos (edad, peso y altura promedio) fueron: $27,4 \pm 8,0$ años, $71,9 \pm 12,2$ kg y $1,76 \pm 0,07$ m, respectivamente. Ambas formulaciones fueron bien toleradas y no se detectaron eventos adversos. En los análisis de laboratorio de seguridad, no se observaron valores anormales clínicamente significativos. Posteriormente, se separó el plasma con micropipeta automática y tips descartables en crioviales que se colocaron en el freezer a -20 °C hasta su posterior análisis.

En la etapa analítica, las muestras de plasma se retiraron del freezer, se descongelaron a temperatura ambiente y luego se procedió al análisis según la técnica correspondiente. Las muestras fueron cuantificadas en 3 secuencias cromatográficas las cuales estuvieron formadas por la curva de calibración, las muestras de los 2 períodos del voluntario y controles de calidad los cuales se utilizaron para aceptar o rechazar la secuencia analítica. Todas las rectas de calibración cumplieron con los criterios de veracidad y precisión correspondiente y todos los controles de calidad tuvieron $ER\% < 15\%$.

A partir de las concentraciones plasmáticas se determinaron los diferentes parámetros farmacocinéticos junto con el área bajo la curva desde cero hasta 192 horas (ABC_{0-192}) y al área bajo la curva desde cero hasta infinito ($ABC_{0-\infty}$) para cada una de las formulaciones ensayadas (Tabla 2.14).

La gráfica de concentraciones plasmáticas promedio de EFV vs tiempo se presentan en la Ilustración 2-C en la que se apreció una gran diferencia entre ambas formulaciones no solo en $C_{m\acute{a}x}$ sino también en ABC.

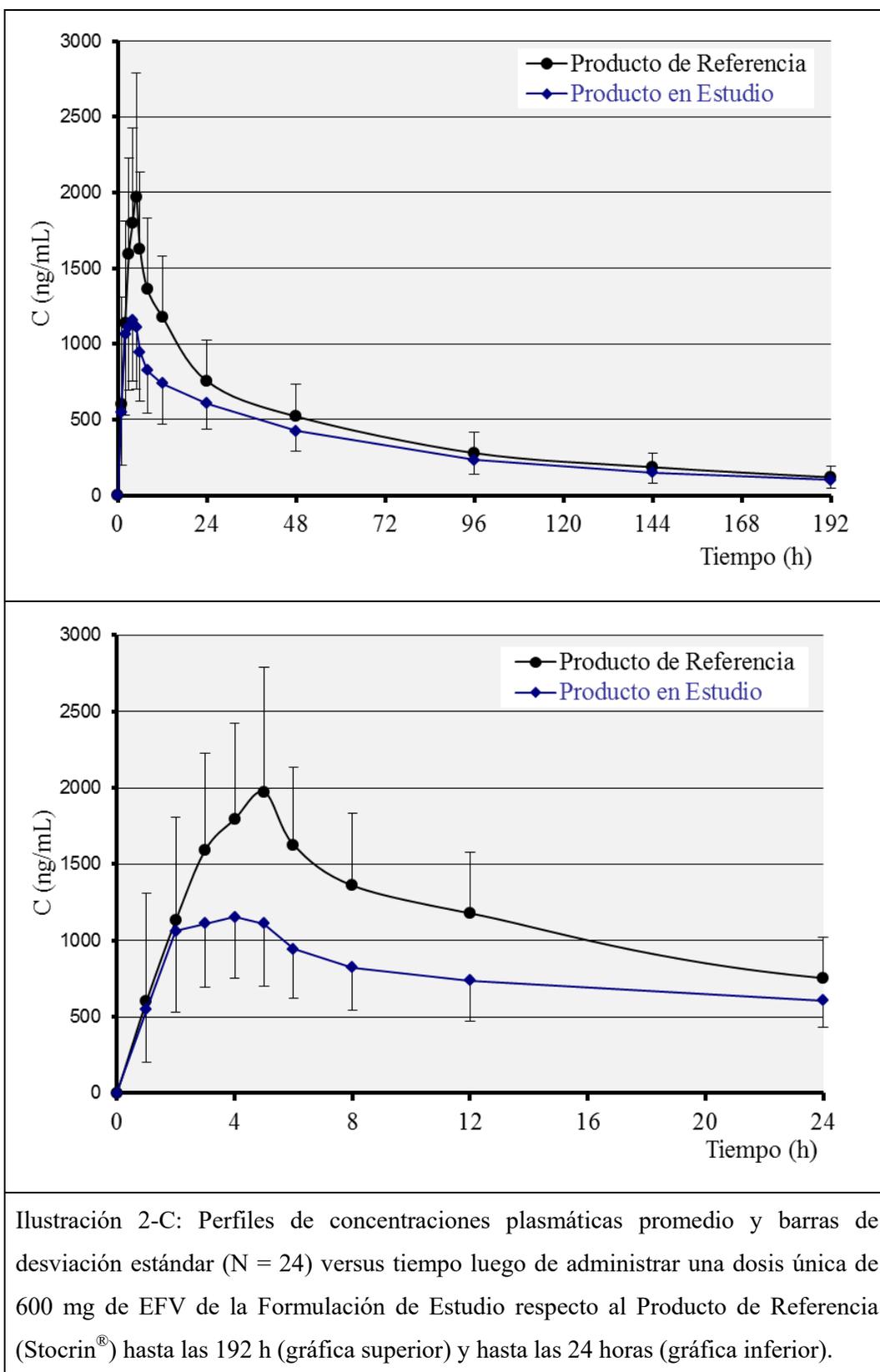


Tabla 2.14: Parámetros farmacocinéticos para cada voluntario.

Sujeto	$C_{m\acute{a}x}$ (ng.mL ⁻¹)		$T_{m\acute{a}x}$ (h)		K_e (h ⁻¹)		$T_{1/2}$ (h)		ABC_{0-t} (ng.mL ⁻¹ h ⁻¹)		$ABC_{0-\infty}$ (ng.mL ⁻¹ h ⁻¹)	
	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>
1	1070	3512	2,9	5,0	0,0124	0,0147	56	47	46135	77938	48744	79812
2	1030	2318	2,0	5,0	0,0123	0,0119	56	58	48393	78836	53127	84667
3	1424	2099	2,1	5,0	0,0110	0,0113	63	61	98230	126249	112488	142016
4	1345	1726	2,0	2,1	0,0110	0,0180	63	38	61630	84012	66848	86964
5	1109	2501	3,0	3,0	0,0125	0,0086	55	81	45701	46927	51056	53360
6	1061	2058	4,0	3,2	0,0098	0,0117	71	59	32801	43526	36195	46008
7	845	2140	1,0	2,0	0,0066	0,0072	104	97	51008	64212	67055	82103
8	2475	1969	5,0	5,0	0,0130	0,0157	53	44	99238	77618	106321	82362
9	1100	1303	4,0	6,0	0,0050	0,0065	139	107	54552	57477	79701	77474
10	1701	2232	2,1	3,0	0,0075	0,0050	92	140	75739	120933	97521	176253
11	1579	2445	3,0	2,0	0,0105	0,0085	66	82	58420	60793	66226	72866
12	959	1779	2,2	1,0	0,0145	0,0128	48	54	61320	79390	65822	85789
13	1628	3969	2,0	5,0	0,0071	0,0080	98	86	70697	121040	93328	149629
14	1448	2136	5,0	5,0	0,0067	0,0080	103	86	67510	83255	85918	104213
15	1085	2028	3,0	5,0	0,0079	0,0088	88	78	67230	100052	90148	126961
16	1367	2371	4,0	5,0	0,0027	0,0067	261	104	74406	85050	163311	116355
17	1472	3657	5,0	5,0	0,0136	0,0126	51	55	82440	122148	89370	133696
18	659	2019	6,1	5,0	0,0080	0,0080	86	87	39209	50522	48529	61444
19	614	1210	3,0	2,0	0,0148	0,0160	47	43	40600	42500	42308	44126
20	1388	2373	2,0	2,0	0,0128	0,0104	54	66	73118	120298	82503	133634
21	1168	2099	3,0	3,0	0,0082	0,0136	84	51	70347	87819	88569	100979
22	1281	1238	12,0	5,0	0,0150	0,0157	46	44	73068	57622	78071	59984
23	893	1907	5,0	2,0	0,0082	0,0098	85	70	56404	71595	69577	80780
24	1584	2369	4,0	5,0	0,0121	0,0120	57	58	45233	60003	51750	66356
Promedio	1262	2227	3,6	3,8	0,0101	0,0109	80	71	62226	79992	76437	93660
MG	1206	2137	3,19	3,46	0,0095	0,0103	73	67	59904	75836	72079	87699
S	393	678	2,2	1,5	0,0033	0,0035	45	25	17373	26558	27728	34922
CV (%)	31	30	60	39	33	32	56	35	28	33	36	37
M_{min}	614	1210	1,0	1,0	0,0027	0,0050	46	38	32801	42500	36195	44126
$M_{m\acute{a}x}$	2475	3969	12,0	6,0	0,0150	0,0180	261	140	99238	126249	163311	176253

En la Tabla 2.15 se presentan los resultados de los IC del 90% para los cocientes Estudio/Referencia de los parámetros farmacocinéticos (ln-transformados) C_{max} , ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$, con un nivel de significancia de 0,05. Los mismos se encuentran fuera de la región de bioequivalencia establecida, con lo cual se acepta la hipótesis nula H_0 por la Prueba de Schuirmann para dos colas que plantea que las formulaciones no son bioequivalentes.

Tabla 2.15: Cocientes Estudio/Referencia obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%.

Parámetro	Relación media %	IC 90%	Probabilidad de exceder los límites de aceptación		
			<80%	>125%	Potencia estadística
In C_{max} %	56,5	50,0 – 63,8	1,0000	0,0000	> 0,80
In ABC_{0-192} %	76,4	70,7 – 82,5	0,8433	0,0000	> 0,99
In $ABC_{0-\infty}$ %	83,4	73,0 – 95,2	0,3004	0,0000	> 0,99

ABC_{0-192} = ABC de 0 hasta las 192 h; $ABC_{0-\infty}$ = ABC de 0 a infinito.

El análisis estadístico también demostró ausencia de efecto período y efecto secuencia. La ausencia de efecto período confirmó que el tiempo de lavado fue adecuado, que no hubo fenómeno de inducción o inhibición metabólica, ausencia de factores externos tanto ambientales como del desarrollo del ensayo. Respecto de la ausencia de efecto secuencia evidenció una adecuada selección de los voluntarios, así como también que ninguna de las 2 formulaciones condujo a modificaciones en los parámetros farmacocinéticos del segundo período. Pero si arrojó efecto formulación lo cual se evidenció a través del análisis de bioequivalencia.

2.6 Conclusiones

Se desarrolló y validó una metodología bioanalítica por HPLC-UV para cuantificar EFV en plasma humano. Las cifras analíticas de mérito estuvieron dentro de los criterios de aceptación de las guías de validación, nacional e internacionales.

El método además de específico, sensible, preciso y exacto resultó adecuado para ser aplicado a muestras proveniente de un estudio de biodisponibilidad comparada

con EFV ya que el límite de cuantificación fue acorde a las concentraciones plasmáticas esperadas a las 192 horas post-administración del fármaco. El procesamiento de muestra resultó sencillo y el tiempo de corrida es un punto a favor teniendo en cuenta el sistema de detección utilizado. Se consideró prudente no reducir el tiempo de corrida con el objeto de cuidar la columna analítica y poder inyectar mayor cantidad de muestras en cada una de las secuencias.

Respecto del estudio de biodisponibilidad comparada, no se reportaron desvíos a los procedimientos operativos estándar y la totalidad de los voluntarios concluyeron la etapa clínica. Todas las muestras tuvieron concentraciones de EFV por encima del LIC, lo cual puso en evidencia el adecuado rango lineal validado, así como también el apropiado muestreo con el fin de describir la curva de biodisponibilidad de EFV en plasma humano.

Los perfiles farmacocinéticos evidenciaron una marcada diferencia entre ambas formulaciones arrojando parámetros farmacocinéticos semejantes a los reportados en bibliografía para la formulación de referencia. Los resultados de este estudio indicaron que la biodisponibilidad de la formulación en estudio es significativamente menor y esto se corroboró a través del análisis estadístico empleado para demostrar bioequivalencia. Por consiguiente, ambas formulaciones (Estudio/Referencia) “no” resultaron terapéuticamente equivalentes por lo tanto la velocidad y cantidad del fármaco activo que se absorbe y llega al tejido o área donde produce su efecto “no” son semejantes.

3. EXTRACCIÓN DE PUNTO DE NUBE PARA DETERMINAR ABACAVIR, EFAVIRENZ, LAMIVUDINA y NELFINAVIR EN PLASMA HUMANO MEDIANTE LC-MS/MS

3.1 Resumen

Se desarrolló y validó una metodología bioanalítica basada en extracción de punto de nube con detección por LC-MS/MS para la determinación de Abacavir (ABC), Efavirenz (EFV), Lamivudina (3TC) y Nelfinavir (NFV) en plasma humano. Es la primera vez que la extracción de punto de nube se utiliza para la extracción y preconcentración de antirretrovirales del plasma humano. Se estudiaron y optimizaron los efectos de variables físico-químicas relevantes sobre la respuesta analítica de cada ARV estudiado, incluyendo pH, concentración de surfactante, tiempo y temperatura de equilibrio; así como su acoplamiento a LC-ESI-MS/MS. Bajo condiciones optimizadas, la metodología resultante fue la siguiente: una alícuota de 500 μL de plasma humano se diluyó con 2 mL de agua desionizada en un tubo de centrifuga de 10 mL. Se añadió una alícuota de 500 μL de Tritón X-114 al 5% m/v y se homogeneizó usando un agitador de vórtice. La solución turbia resultante se mantuvo a 65 °C durante 20 min para promover la condensación de micelas del tensioactivo. Después se centrifugó a 3000 g durante 5 min para separar la fase rica en tensioactivo. Luego de descartar el sobrenadante acuoso, se añadieron 400 μL de ACN a la fase rica en tensioactivo restante y se centrifugó para precipitar proteínas. Se transfirió una alícuota de 150 μL del sobrenadante a un vial de 2 mL y se diluyó adicionalmente con 400 μL de agua desionizada. Se inyectó una alícuota de 30 μL de la solución así preparada y se analizó en el LC-MS/MS. Los límites de detección del método para ABC, EFV, 3TC y NFV bajo condiciones optimizadas fueron 31, 77, 57 y 21 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. El CV% para los analitos estudiados fue <15%, excepto en el LIC, que fue <19%. Los valores de recuperación oscilaron entre 81% y 107%. La metodología propuesta se aplicó con éxito para el análisis de ABC, EFV, 3TC y NFV en plasma humano dentro del rango de concentración de 43-6816, 125-4992, 81-3248 y 49-7904 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. La metodología bioanalítica propuesta cumple con los requisitos de normas internacionales, lo que la hace viable para ser aplicada a estudios farmacocinéticos de los cuatro ARVs, así como para el seguimiento terapéutico de pacientes con VIH.

3.2 Introducción

Abacavir (ABC), Efavirenz (EFV), Lamivudina (3TC) y Nelfinavir (NFV) son drogas antirretrovirales prescritas frecuentemente para el tratamiento del VIH (Yeni y col., 2004). La terapia basada en la combinación antirretroviral se utiliza para el tratamiento del paciente infectado con el VIH. La dosis exacta de ARV es esencial en este tipo de terapia para garantizar la supresión viral, así como para evitar efectos adversos del paciente (Donnerer, Kronawetter, Kapper, Haas, y Kessler, 2003). Además, los informes muestran que los pacientes cuya terapia se basa en el dosaje plasmático de ARVs, responden mejor que los individuos que siguen un régimen estándar y/o fijo (Cuevas y col., 2002). Debido a la complejidad presentada por el manejo de pacientes infectados con VIH, es evidente que el monitoreo farmacocinético del tratamiento con ARVs puede mejorar sustancialmente el diseño del protocolo de terapia.

Para evaluar los niveles plasmáticos de fármacos en una terapia de combinación de ARVs es importante contar con una metodología bioanalítica capaz de analizar múltiple analitos en una sola muestra. Varias metodologías se propusieron para el análisis de ARVs en plasma mediante el uso de técnicas instrumentales modernas, incluida LC-MS/MS (Droste & Aarnoutse, 2007; Theron, Cromarty, Rheeders, & Viljoen, 2010; Yadav, Gupta, Singhal, & Shrivastav, 2010). Como es bien sabido, a pesar de la sobresaliente sensibilidad y selectividad de LC-MS/MS, se requiere una preparación de muestra exhaustiva para un análisis apropiado de múltiples ARVs, especialmente cuando presentan diferencias significativas en sus propiedades fisicoquímicas. Este hecho, junto con la limitación del volumen de la muestra, convierte a la etapa de preparación en un cuello de botella para el análisis de múltiples ARVs en muestras biológicas especialmente en estudios clínicos de farmacocinética comparada (Zhang, Fu, Gale, Aubry, y Arnold, 2009).

Se han reportado varias técnicas de preparación de muestras para extracción y aislamiento de ARVs del plasma antes del análisis cromatográfico. Aunque el más comúnmente reportado es la extracción líquido-líquido (D'Avolio y col., 2006) y la extracción en fase sólida (Colombo y col., 2006; Rezk y col., 2003); se caracterizan por ser laboriosas, requerir un gran volumen de muestra y consumir tiempo. Una desventaja adicional de la extracción líquido-líquido (L-L) es el uso de una cantidad significativa de solventes orgánicos y tóxicos. Además, debido a la baja concentración de ARVs en

el plasma, generalmente se requieren grandes volúmenes de muestra para asegurar su detectabilidad (Dailly, Raffi, y Jolliet, 2004). En los últimos años, con el creciente interés por la miniaturización en química analítica enmarcada en el concepto de química verde (Anastas, 1999) se han reportado algunos enfoques miniaturizados más recientes de extracción L-L. Se han desarrollado varios tipos diferentes de microextracción en fase líquida (LPME), incluyendo microextracción de gota única (SDME) (Stalikas, 2007), microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Cheng, Zhou, Zuo, Dai, y Guo, 2010) y microextracción de emulsión asistida por ultrasonido (USAEME) (Fontana, Silva, Martínez, Wuilloud, y Altamirano, 2009). Una alternativa a la microextracción con solventes orgánicos tradicionales es la técnica de extracción por punto nube (CPE por sus siglas en inglés) (Fontana y col., 2009; Wentao y col., 2009). El fenómeno de formación de micelas se basa en la agregación de monómeros de tensioactivos bajo condiciones físico-químicas específicas, las cuales se dispersan en el seno de la muestra acuosa (Carabias-Martínez y col., 2000; Sirimanne y col., 1998). Las micelas resultantes proporcionan una nueva fase dentro del seno de la muestra con regiones de diversas polaridades, lo cual aumenta su potencial para solubilizar analitos en una amplia gama de polaridades. La afinidad entre los analitos y las micelas depende de su naturaleza y de la estructura del tensioactivo. Analitos hidrófobos tienen afinidad por el núcleo micelar hidrófobico, mientras que los analitos polares/cargados presentan más afinidad por la región polar a través de diferentes tipos de interacciones (por ejemplo, electrostática, π -cation, enlaces de hidrógeno, etc.). Asimismo, se incorporan analitos anfífilicos a las micelas a través de ambas interacciones, hidrofóbicas y polares, formando agregados mixtos (Sirimanne y col., 1998; Wentao y col., 2009). De este modo, los analitos pueden extraerse in situ en la fase micelar y separarse selectivamente del volumen de la muestra (Fontana, Camargo, y Altamirano, 2010). CPE se ha aplicado con éxito antes del análisis cromatográfico para la extracción de una amplia gama de analitos desde muestras biológicas (Fontana y col., 2010; Wentao y col., 2009; Xiao y col., 2007), bioquímicas y ambientales, incluyendo estrógenos, vitamina A, vitamina E (Sirimanne y col., 1998), varios tipos de proteínas, así como también iones metálicos (Shemirani y col., 2004; Zhu y col., 2006). Las ventajas analíticas de CPE incluyen alta eficiencia de separación, aislamiento selectivo y flexibilidad para su acoplamiento a diferentes instrumentos analíticos (Shemirani y col. 2004; Rezk y col., 2003). En este sentido, CPE es de bajo costo, simple de operar y amigable con el medio ambiente, ya que utiliza tensioactivos, lo que reduce el consumo de solventes orgánicos.

3.3 Objetivos

- Desarrollar una metodología bioanalítica basada en CPE para determinar de ARVs, tales como ser Efavirenz, Nelfinavir, Abacavir y Lamivudina, en plasma humano por LC-MS/MS.
- Comprender el efecto de los factores físico-químicos que gobierna la eficiencia de extracción de la técnica CPE y optimizar la metodología de extracción.
- Validar la metodología bioanalítica y comparar las cifras analíticas de mérito con metodologías previamente desarrolladas.

3.4 Experimental

Para el desarrollo y validación de la metodología bioanalítica se utilizó el equipamiento que consta en la Tabla 3.1, los reactivos y estándares presentados en las Tabla 3.2 y Tabla 3.3, respectivamente.

Tabla 3.1: Equipamiento y materiales generales.

Componente	Marca	Modelo
Cromatógrafo líquido	Shimadzu	LC 20AD xr
Desgasificador	Shimadzu	DGU-20A3
Inyector automático	Shimadzu	SIL-20A xr
Espectrómetro de masas	ABSciex	API 3200
Software	Analyst	Versión 1.5.2
Vortex	Boeco	V1 Plus
Centrífuga	Eppendorf	5702R
Balanza analítica	Ohaus	Discovery DV215CD
Micropipetas automáticas	Brand	P100, P200 y P1000

Tabla 3.2: Reactivos

Componente	Marca	Lote
ACN - grado HPLC	Carlo Erba	D4D045254D
H ₂ O - grado HPLC	TEDIA	13110085
MeOH - grado HPLC	Carlo Erba	V4A548174A
Ácido Fórmico	Carlo Erba	Q5A012205C

Tabla 3.3: Estándares analíticos.

Estándar	Propósito	Calidad	Pureza	Lote
Efavirenz	Analito a cuantificar	Primario-USP®	99,8%	F0G376
Lamivudina	Analito a cuantificar	Primario-USP®	99,7%	H0I378
Mesilato de Nelfinavir	Analito a cuantificar	Primario-USP®	98,3%	F0K050
Sulfato de Abacavir	Analito a cuantificar	Primario-USP®	99,4%	F1L487
Nelfinavir-d3	EI	Primario-TRC	98,0%	SDJ-86-3

Para los ensayos de especificidad, linealidad, controles de calidad, recuperación y preparación de controles de calidad se utilizaron muestras blanco de plasma humano de 10 individuos provenientes de un ensayo clínico autorizado por la ANMAT tal como se indica en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Material biológico.

Componente	Fuente	Lote
Plasma Humano Normal	Dominguezlab	PL-Normal-EFV-P1-6
Plasma Humano Lipémico	Dominguezlab	PL-Lipémico-EFV-P1-3
Plasma Humano Hemolizado	Dominguezlab	PL-Hemolizado-EFV-P1-2

3.4.1 Metodología de trabajo

La eficiencia de CPE está condicionada por variables físico-químicas, así como de los analitos y de la naturaleza de la matriz de la muestra. Por lo tanto, es interesante estudiar el efecto de las variables físico-químicas experimentales sobre la respuesta analítica de los ARVs y optimizarlas para lograr selectividad y una alta sensibilidad adecuada para el propósito propuesto.

El desarrollo de métodos bioanalíticos con soluciones sintéticas y posterior aplicación en muestras reales generalmente requiere ajustes severos. Esto podría conducir a un método diferente al desarrollado; es por ello que se trabajó directamente sobre la matriz real de estudio a lo largo del proceso de desarrollo y validación. Adicionalmente, la mayoría de las guías internacionales de validación de métodos bioanalíticos requieren calibrar sobre las matrices de estudio, siempre que sea posible.

En este sentido se evaluaron diferentes fuentes de plasma (normal, lipémico y hemolizado), así como todas las variables experimentales que condicionan las respuestas analíticas de los ARVs, incluyendo pH de extracción, concentración de surfactante, tiempo y temperatura de extracción, efecto salino desplazante y el uso de modificadores

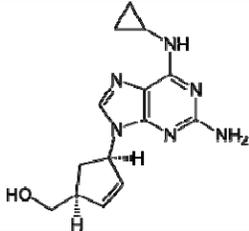
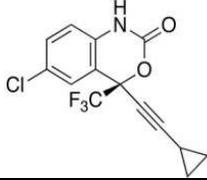
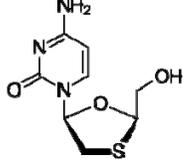
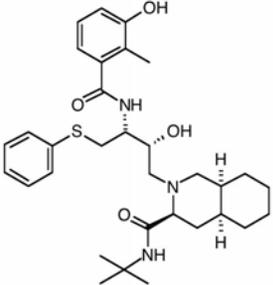
incluyendo ACN, MeOH y sales (cloruro de sodio y acetato de amonio), respectivamente. Estos estudios se realizaron modificando una variable a la vez manteniendo constante los demás. El área del pico cromatográfico de cada analito fue la respuesta analítica considerada para evaluar el impacto de las condiciones experimentales modificadas en los respectivos ensayos.

3.5 Resultados y Discusión

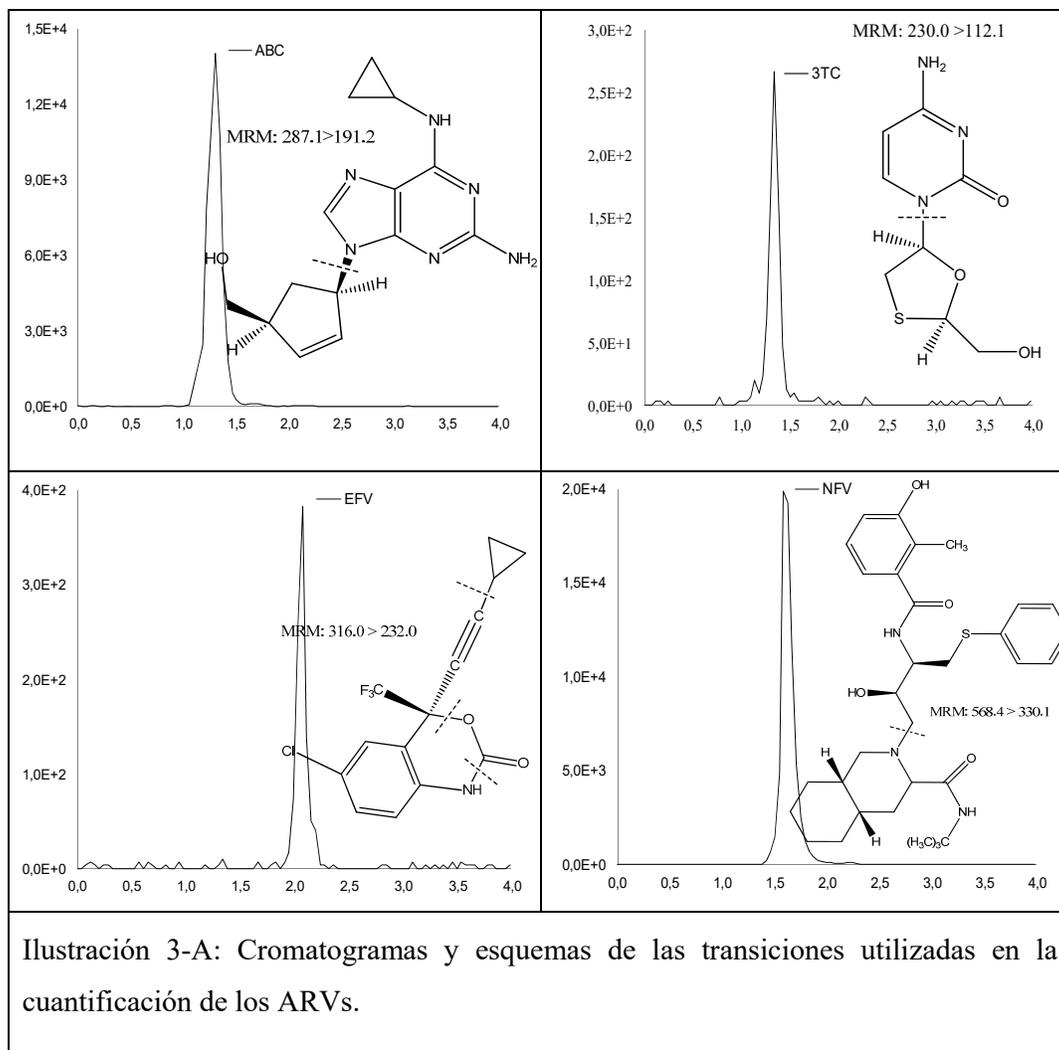
3.5.1 Desarrollo de la metodología bioanalítica

La optimización en el MS/MS se llevó a cabo mediante infusión directa con bomba de jeringa de soluciones estándares de cada analito en la fuente ESI a un flujo de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando una bomba de jeringa incorporada en el equipo. Las características químicas de los compuestos analizados se detallan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Información fisico-química de ABC, EFV, 3TC y NFV.

Analito	Estructura Química	Fórmula Química	Masa molecular (g/mol)	pK _a	Solubilidad en H ₂ O (g/L)
ABC		C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O	286,3	5,0	1,2
EFV		C ₁₄ H ₉ ClF ₃ NO ₂	315,7	10,2	0,0092
3TC		C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	229,2	4,3	Soluble
NFV		C ₃₂ H ₄₅ N ₃ O ₄ S	567,8	6,0 y 11,1	Muy poco soluble

Se seleccionó el ión base de cada ARV trabajando en modo “escaneo completo” en el rango de 50 a 600 m/z. En todos los casos la mejor señal se obtuvo trabajando en modo positivo $[M + H]^+$. Se optimizaron los diferentes potenciales del instrumento para obtener la mayor señal de los iones producto proveniente de los diferentes picos base. En Tabla 3.6 se presentan las condiciones del espectrómetro para trabajar en modo MRM⁺ y en la Ilustración 3-A se esquematiza la transición utilizadas para llevar a cabo el análisis cuantitativo de los analitos en estudio.



Las demás condiciones operativas fueron optimizadas en conjunto con la cromatografía, siendo las mismas: temperatura de la fuente 100 °C, tiempo de permanencia 250 ms, voltaje en la aguja de nebulización de iones 5500 V, presión del gas de nebulización (GS1:N₂), presión del gas cortina 20 psi, presión del gas de colisión (N₂) 7 psi, presión y temperatura del gas de secado (GS2:N₂) 20 psi y 500 °C respectivamente.

Tabla 3.6: Parámetros del MS para detectar ABC, EFV, 3TC, NFV y NFV-d3.

Analito	Q1→Q3 (<i>m/z</i>)	EP (Volts)	DP (Volts)	CEP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
ABC	<u>287,1→191,2</u> 287,1→174,2	5	30	18,2	35	5
EFV	<u>316,0→232,0</u> 316,0→168,2			19,1		
3TC	<u>230,0→112,1</u> 230,0→95,0			16,3		
NFV	568,4→467,3 <u>568,4→330,1</u>			27,5		
NFV-d3	571,4→470,3 <u>571,4→333,1</u>			27,5		

EP: Potencial de entrada; DP: Potencial de desglose; CEP: Potencial de entrada a la celda de colisión; CE: Energía de colisión;

CXP: Potencial de salida de la celda de colisión. La transición de cuantificación está subrayada.

La separación cromatográfica se llevó a cabo de manera isocrática, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Condiciones cromatográficas para cuantificar ABC, 3TC, NFV y EFV en plasma humano por LC-MS/MS utilizando NFV-d3 como EI.

Parámetro	Descripción
Fase Móvil	Bomba A: NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂ 10 mM: ACN (70:30 v/v) Bomba B: ACN
Flujo (mL/min)	0,25
Columna Analítica	Thermo, Hypersil GOLD 100 × 2,1 mm, 3,0 μm
Temperatura de Columna (°C)	40
Temperatura del inyector (°C)	20
Volumen de inyección (μL)	30
Tiempo de corrida (minutos)	4 min
Tiempos de retención (minutos)	ABC: 1,30 3TC: 1,34 NFV: 1,60 NFV-d3: 1,61 EFV: 2,06

En la Ilustración 3-B se presentan los cromatogramas representativos de plasma fortificado con solución estándar de los ARVs en estudio.

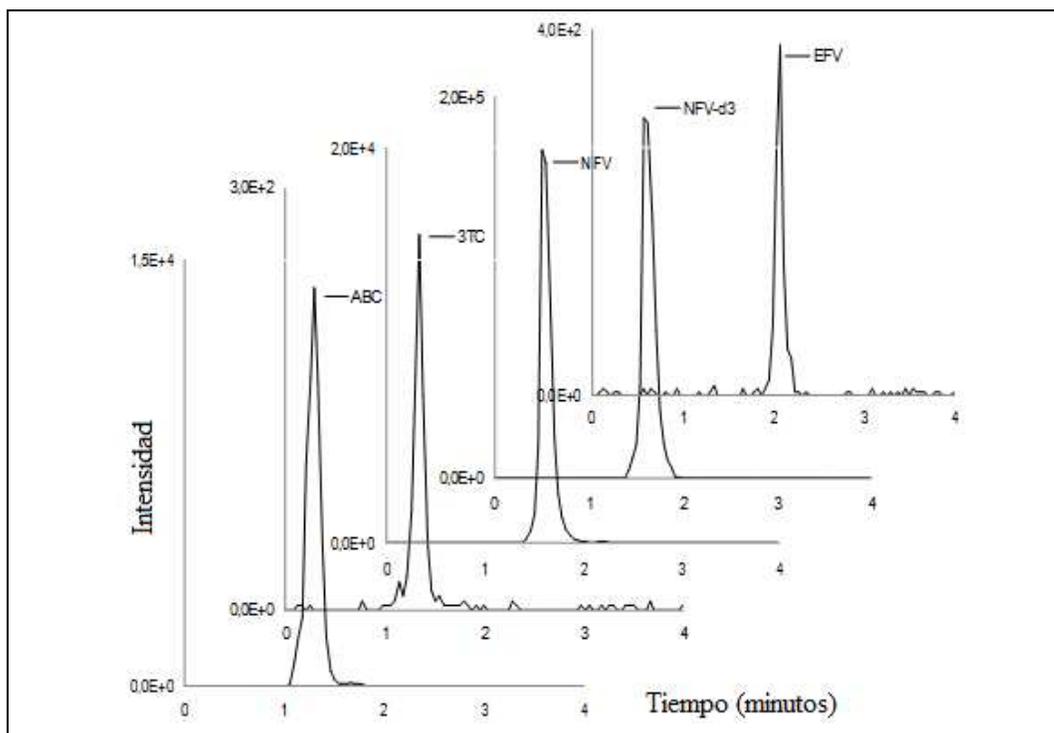


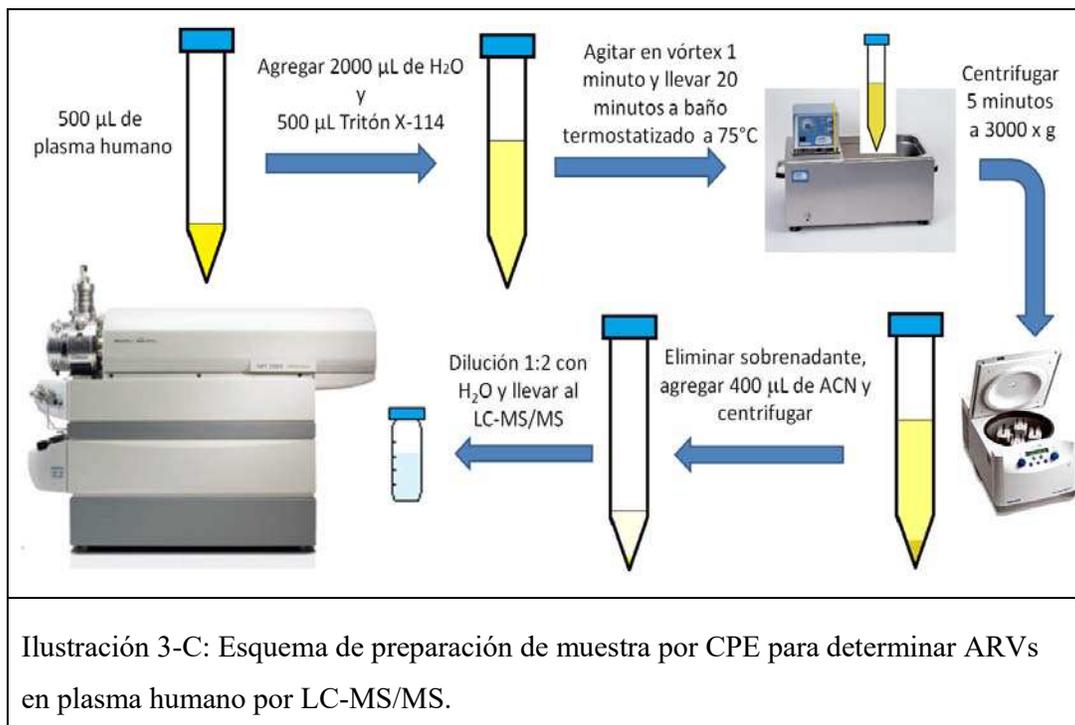
Ilustración 3-B: Superposición de cromatogramas de muestra de plasma fortificadas con 1,7, 1,2, 0,8, 1,9 y 1,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ABC, EFV, 3TC, NFV y NFV-d3 respectivamente.

Los blancos de plasma (libre de fármacos) fueron obtenidos de voluntarios sanos que participaron del ensayo clínico de Dominguezlab código PRO-BEQ-EFV-001-V.01 (Tabla 3.4). La toma de muestras se llevó a cabo utilizando un sistema de catéter (BD Saf-T-Intima™, BD Vacutainer®) y jeringas de 5 mL. La sangre fue colectada dentro de tubos polipropileno de 4 mL heparinizados (NAHEP PLH 13X75 4.0 PLBL GN, BD Vacutainer®, Broken Bow NE 68822 US) y centrifugados a 1.400 g para separar el plasma del paquete celular. Alícuotas de 1 mL fueron preservadas en crioviales de 2 mL y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.2 Metodología de preparación de muestras por CPE

Bajo condiciones optimizadas una alícuota de 500 μL de plasma humano se diluyó con 2 mL de agua destilada en un tubo de centrifuga de 10 mL. Se añadió una alícuota de 500 μL de Tritón X-114 al 5% m/v y se homogeneizó usando un agitador de vórtice. La solución turbia resultante se mantuvo a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos para

promover la condensación de las micelas de tensioactivo. Después se centrifugó a 3000 g durante 5 min para separar la fase rica en tensioactivo. Luego de descartar el sobrenadante acuoso, se añadieron 400 μL de ACN a la fase rica en tensioactivo y se centrifugó para precipitar proteínas. Se transfirió una alícuota de 150 μL del sobrenadante a un vial de 2 mL y se diluyó adicionalmente con 400 μL de H_2O HPLC y se llevó al inyector del LC-MS/MS (Ilustración 3-C).



3.5.2.1 Concentración de surfactante Tritón X-114

Tritón X-114 es uno de los tensioactivos no iónicos ampliamente utilizado para CPE (Han y col., 2008). En la Ilustración 3-D se muestra la estructura del Tritón X-114 (4-octil fenoletoxilato), donde "n" indica el número promedio de unidades de óxido de etileno a un lado de la cadena. Estos son compuestos en los que el grupo hidrofílico es una cadena de poli-oxietileno fijada por la función hidroxilo o amina.

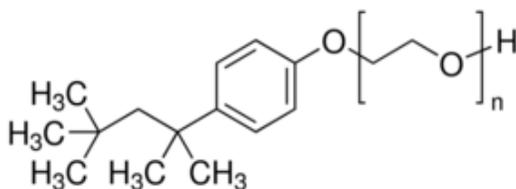


Ilustración 3-D: Estructura química Tritón X-114, n = 7-8

El punto de enturbiamiento de una solución acuosa de 2,0% m/v de Tritón X-114 en ausencia de aditivos es 27 °C, el cual puede variar de 20 °C a 30 °C dependiendo de la concentración exacta de tensioactivo empleado (Saitoh y Hinze, 1995). En la Tabla 3.8 se presentan las principales propiedades fisicoquímicas de Tritón X-114 (Pisconti y Huanca, 2015).

Tabla 3.8: Propiedades fisicoquímicas Tritón X-114.

Propiedad	Tritón X-114
Estado	Líquido
Unidades de óxido de etileno	7-8
Color, APHA	100
Gravedad Específica, 25 °C, g.mL ⁻¹	1,054
Densidad, lb/gal	8,8
Viscosidad, Brookfield a 25 °C, cP	260
Punto de nube, 1% solución acuosa, °C	22
Concentración Micelar Crítica (CMC) mM	0,2

Los informes indican que la cantidad de Tritón X-114 no sólo afecta a la eficiencia de extracción, sino también el volumen de fase rica en tensioactivo resultante después de la separación de fases (Wentao y col., 2009). Cuanto menor sea la concentración inicial de tensioactivo, menor será el volumen resultante de la fase rica en tensioactivo, lo que conducirá a una mayor sensibilidad de la metodología bioanalítica. Sin embargo, es bien sabido que un pequeño volumen de fase rica en tensioactivos (<20 µL) conduce a dificultades operativas para separarla eficientemente del sobrenadante, lo que afecta a la precisión y reproducibilidad de la metodología (Sosa Ferrera, Padrón Sanz, Mahugo Santana, y Santana Rodríguez, 2004). Teniendo en cuenta estos aspectos, se ensayaron cuatro concentraciones de Tritón X-114: 2,5, 5,0, 7,5 y 10,0% m/v. Concentraciones más altas de tensioactivo no se evaluaron ya que podrían afectar al rendimiento del espectrómetro de masas, principalmente por obstrucción de la aguja en la fuente de ionización, conduciendo a la supresión de señal y posiblemente provocar suciedad en las guías de iones. Los pasos de extracción se llevaron a cabo como se describe en la sección 3.5.2.

Teniendo en cuenta que diferentes concentraciones de tensioactivo conduciría a diferentes volúmenes de fase rica en tensioactivo, se hizo referencia al mismo volumen final (200 μ L) con H₂O para todas las concentraciones de tensioactivos ensayadas para lograr resultados comparables.

A partir de la Ilustración 3-E, se puede observar que la respuesta analítica relativa de ABC y 3TC aumentó a medida que aumentaba la concentración de tensioactivo. EFV presentó la respuesta analítica más alta en la menor concentración de tensioactivo disminuyendo hasta aproximadamente 30% para la mayor concentración de Tritón X-114 evaluada. NFV presentó su mayor respuesta relativa a 5% m/v, cayendo a 75% para 10% m/v de tensioactivo.

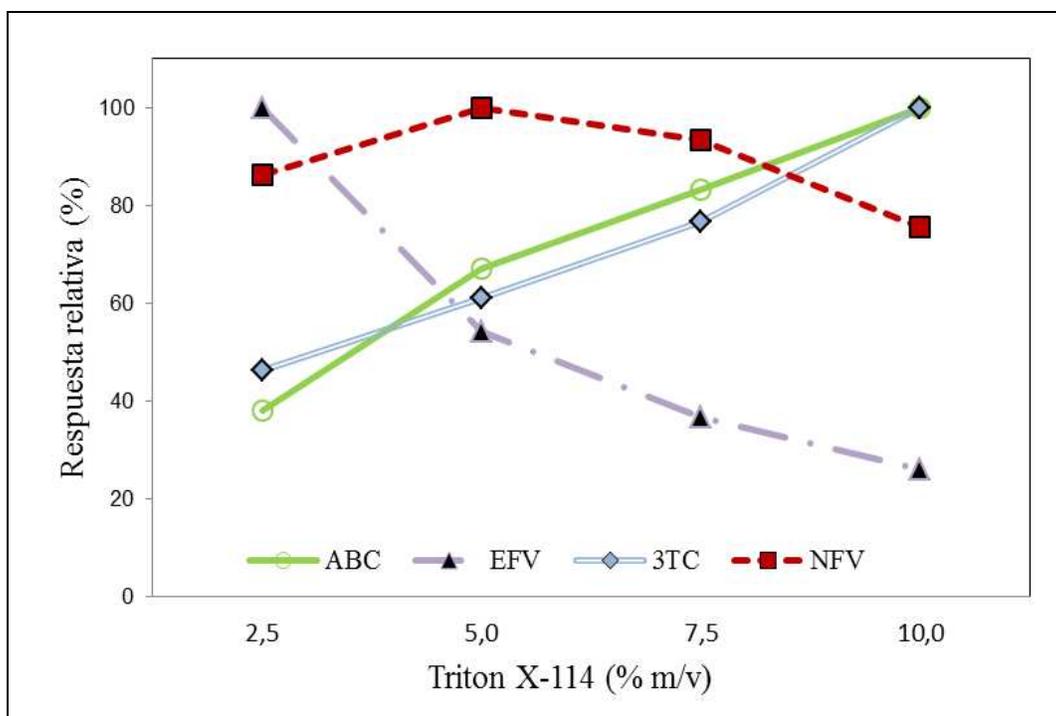


Ilustración 3-E: Efecto en la respuesta relativa porcentual en función de la concentración de Tritón X-114 en la extracción de ARVs a partir de plasma humano.

Estos resultados podrían atribuirse a las propiedades físico-químicas de los analitos que influyen en la eficiencia de extracción de la técnica CPE, y por lo tanto las respuestas analíticas (Knox y col., 2011). En el pH de trabajo 3TC y ABC preveleían en sus formas iónicas, mientras que EFV y NFV en sus formas neutras, presentando diferentes comportamientos de solubilidad en agua (Tabla 3.5) coherente con sus respuestas analíticas obtenidas. En este sentido, se esperó obtener las respuestas más bajas para 3TC y ABC, ya que al ser analitos más polares y el surfactante no-iónico,

limitó así la afinidad entre ellos y las micelas. El rendimiento de EFV podría atribuirse al hecho de que a la concentración de tensioactivo más baja, la eficiencia de extracción fue máxima dando así la mayor respuesta analítica para este analito. Una mayor concentración condujo a un mayor volumen de fase rica de tensioactivo; por lo tanto, la concentración de los analitos extraídos fue menor debido a un efecto de dilución. NFV presentó la mayor respuesta analítica a concentración intermedia, disminuyendo en la fase rica en tensioactivos resultante cuando se usó una concentración de tensioactivo mayor. Los analitos más polares conducen a un mayor radio molecular debido a la solvatación, reduciendo su interacción con las micelas. A pesar del efecto de supresión iónica en el método de ionización por electronebulización proporcionada por la presencia de tensioactivo, 3TC y ABC evidenciaron una mayor respuesta analítica a concentraciones más altas de tensioactivo en la extracción. Esta mejora en la respuesta analítica podría deberse a una mayor eficiencia de extracción a mayores concentraciones de tensioactivo.

Basándose en estos resultados experimentales, se adoptó Tritón X-114 al 5% m/v como condición de trabajo, considerando la mejor concentración de compromiso que condujo a una respuesta analítica exitosa para los ARVs estudiados. Este hecho es relevante para el desarrollo de una metodología bioanalítica para un análisis multicomponente.

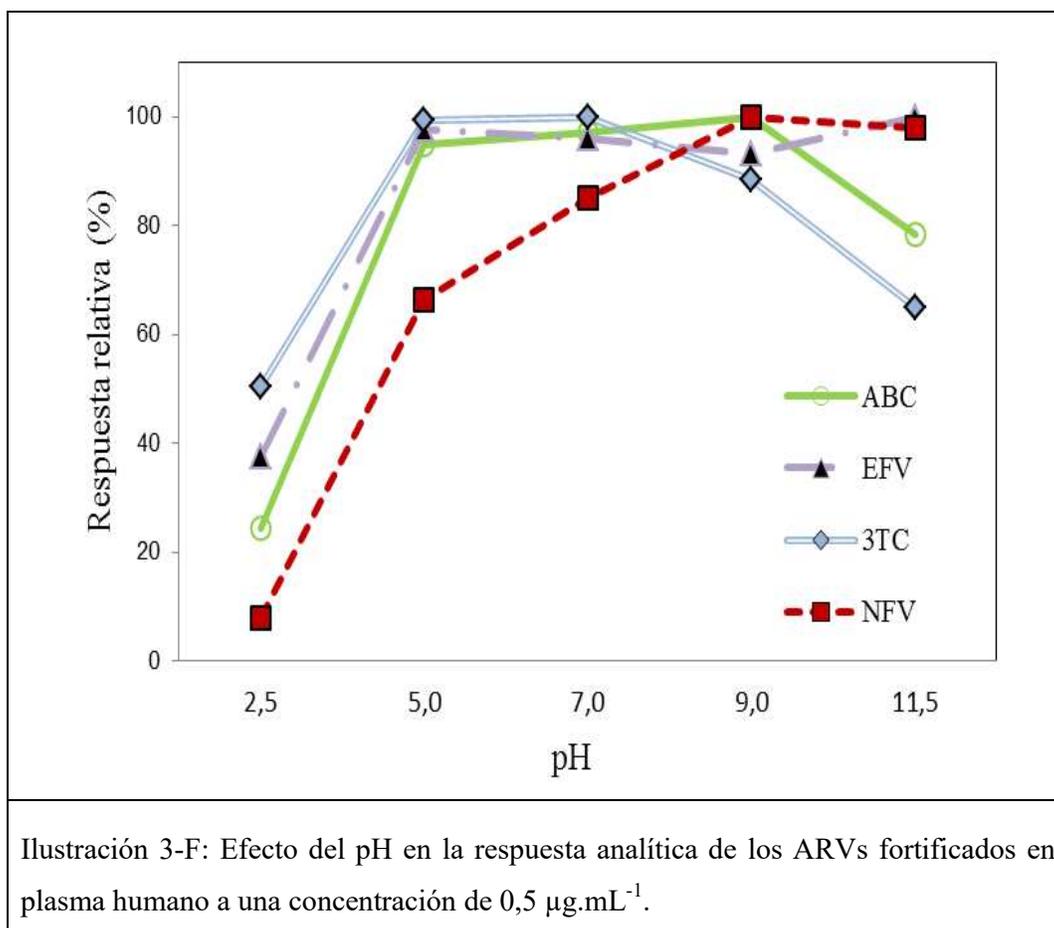
3.5.2.2 Efecto del pH en CPE

CPE no se había aplicado previamente para la extracción de ARVs en ninguna matriz; por lo tanto, no había pruebas de cuál podría ser el efecto del pH en la señal analítica para esta metodología. Las respuestas analíticas estarían condicionadas por CPE y eficiencia instrumental. CPE está fuertemente condicionado por las propiedades fisicoquímicas de los analitos, matriz de muestra, así como particularidades CPE (tipo de surfactante y concentración, modificadores de matriz, etc.). Por otra parte, la eficiencia instrumental también está condicionada por características de matriz de muestra y propiedades fisicoquímicas de los analitos, además de las particularidades del sistema de detección. Es bien sabido que la matriz plasmática contiene proteínas disueltas (6 – 8 %) (por ejemplo, albúminas, globulinas y fibrinógeno), glucosa, factores de coagulación, electrolitos (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- , etc.) y el dióxido de carbono (Chiu y col., 2010; Lehninger et al, 2008) que podría afectar la eficiencia de extracción de la técnica CPE (Melnyk, Wolska, y Namieśnik, 2014).

Teniendo en cuenta que los ARVs estudiados son especies ionizables según su pKa (Tabla 3.5), se esperaba que el pH de la extracción pudiera afectar sus respuestas analíticas de la siguiente manera: condicionando el equilibrio ionizable del ARVs afectando su afinidad por las micelas y consecuentemente su eficiencia de extracción. Debido al carácter no iónico del surfactante, no se esperaba ver un efecto de pH sobre las micelas (Carabias-Martínez y col., 2000; Sirimanne y col., 1998). Teniendo en cuenta esta información, se analizó el efecto del pH en la respuesta analítica de los ARVs. En la Ilustración 3-F se presentan los resultados de los ensayos realizados a los diferentes pH. Como se puede observar a pH 2,5 se obtuvieron las respuestas relativas más bajas para todos los ARVs (<50%). Esta respuesta podría deberse a que los analitos se encontraban cargados (protonados), por lo que se esperaba que tengan menor afinidad por las micelas no iónicas y por lo tanto menor eficiencia de extracción. Adicionalmente se observó una ineficaz separación de fases evidenciadas por un pequeño volumen de la fase rica en surfactante (<50 μ L), lo que afectó la eficiencia de extracción y consecutivamente su respuesta analítica. Considerando la matriz de trabajo (plasma), es posible que este pH de extracción haya condicionado la agregación de las micelas y por lo tanto la eficiencia de extracción de los analitos. A pH 5, el volumen de fase rica en tensioactivo resultante fue de aproximadamente 450 μ L y mostró turbidez, que se aclaró después del paso de precipitación de proteínas. A este pH, 3TC y ABC prevalecieron en forma iónica, mientras que NFV y EFV en su forma no iónica de acuerdo con su pKa. Sobre esta base, se esperaba una menor respuesta relativa de los analitos iónicos, ya que tendrían menor afinidad por la micela no iónica, y por lo tanto, una menor eficacia de extracción para estos ARV. Sin embargo, la respuesta analítica de los ARVs alcanzó sus valores más altos a pH 5 (> 95%), excepto para NFV (aproximadamente 70%), y permaneció invariante sólo para EFV a valores de pH más altos. Estos resultados podrían ser debidos a la compensación entre el efecto de afinidad del analito por las micelas y su eficiencia en la formación, dando como resultado una mejora de la señal analítica. Las respuestas analíticas del NFV alcanzaron los valores más altos (>95%) a pH 9 y permanecieron invariantes a pH 11,5. Las respuestas analíticas de 3TC y ABC disminuyeron desde pH 7 y pH 9, respectivamente.

La separación de fases fue eficiente a partir de pH 7 en adelante, obteniéndose un volumen de fase rica en tensioactivo de aproximadamente 350 μ L. La fase rica en tensioactivo mostró la deshidratación más alta y el volumen más pequeño

(aproximadamente 300 μL) a pH 11,5; resultado en un mejor rendimiento de separación de fases y reducción de la pérdida de la fase rica en tensioactivo cuando el sobrenadante fue descargado. La disminución de la señal analítica de ABC y 3TC a pH 11,5 podría deberse a un efecto de supresión de señal en el espectrómetro de masas debido a una alta carga de matriz y surfactante en el frente de solvente. Teniendo en cuenta el corto tiempo de retención de ABC y 3TC (1,30 y 1,34 min, respectivamente), se esperaba que su señal analítica fuera más afectada por este fenómeno que para NFV y EFV, cuyo tiempo de retención fue mayor (1,61 y 2,06 min, respectivamente).



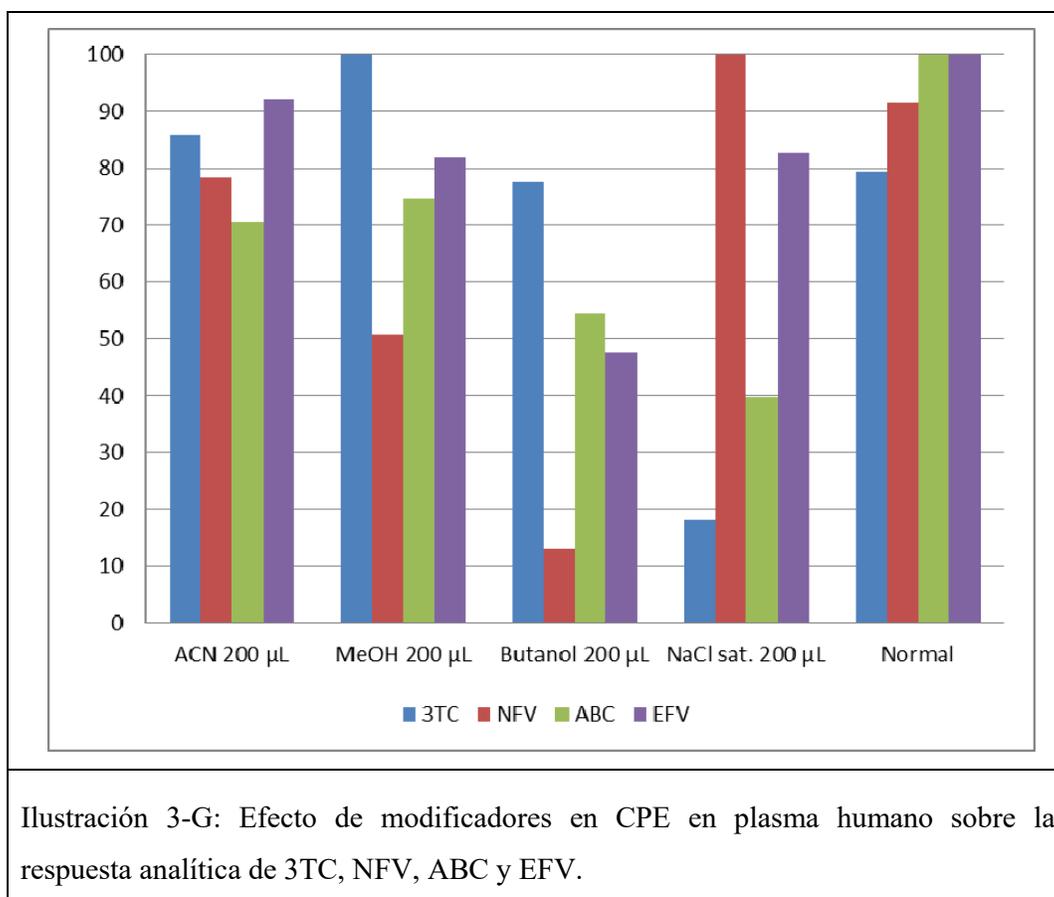
Basándose en estos resultados, se adoptó pH 7 como condición de trabajo considerando que es el mejor pH de compromiso que conduce a una respuesta analítica exitosa para los ARVs estudiados. Teniendo en cuenta que el pH del plasma humano es aproximadamente 7,4 (Lehninger y col., 2008) y que el tensioactivo es no iónico, el pH para la extracción de los ARVs no se ajustó, siendo esto relevante para el desarrollo de una metodología analítica por CPE para el análisis multicomponentes ya que simplifica el procedimiento.

3.5.2.3 Optimización de la temperatura y tiempo de extracción

Las temperaturas de extracción por encima del punto de enturbiamiento, y/o el tiempo de extracción prolongado (>2 min), disminuyen el contenido de agua de la fase resultante del agente tensioactivo y, por lo tanto, su volumen final. Este argumento se basa en el hecho de que a medida que aumenta la temperatura de extracción, los enlaces de hidrógeno se rompen conduciendo, por lo tanto, a la deshidratación de las micelas (Sosa Ferrera y col., 2004). Por otro lado, es importante tener en cuenta que el uso excesivo de temperaturas elevadas puede reducir la eficiencia de CPE, debido a la estabilidad térmica de los agregados de surfactante (Giokas, Sakkas, Albanis, y Lampropoulou, 2005), así como a la labilidad de los analitos. Por lo tanto, fue interesante estudiar el efecto de la temperatura y el tiempo de extracción dentro del rango de 45-75 °C y 10-30 min, respectivamente. Los ensayos de temperatura de extracción se llevaron a cabo considerando un tiempo de extracción de 20 min. mientras que los ensayos de tiempo, se llevaron a cabo a la temperatura óptima resultante. A medida que la temperatura aumentó de 45 a 65 °C, se observó una mejor separación de fase rica en tensioactivo así como una respuesta aumentada de los analitos. Los resultados no mostraron cambios significativos ni en el rendimiento de CPE ni en la respuesta analítica de los ARVs estudiados a temperaturas de extracción superiores a 65 °C. Para el tiempo de extracción, se observó que, al aumentarlo, la respuesta relativa se incrementó, alcanzando la máxima respuesta analítica a los 20 min, después del cual permaneció invariante. Por lo tanto, se seleccionó un tiempo de extracción de 20 min y una temperatura de 65 °C para la extracción.

3.5.2.4 Efecto de modificadores en CPE

La adición de solventes orgánicos dificultó la formación de las micelas y no logró mejorar la eficiencia de extracción respecto de la condición normal (sin agregado de modificadores: ACN, MeOH, Butanol y NaCl). En la Ilustración 3-G se puede observar que la respuesta relativa respecto de la mejor señal obtenida para EFV y ABC es 100% para la condición sin modificadores. Si bien para 3TC y NFV la mejor respuesta se obtuvo con los agregados de MeOH y NaCl respectivamente, su señal no disminuyó tanto para la condición sin modificador, optando por dicha condición para llevar a cabo la CPE.



3.5.3 Resultados de la validación del método analítico

El método bioanalítico propuesto se evaluó en términos de selectividad, sensibilidad, linealidad, recuperación, veracidad y precisión intra e interdía. Las cifras analíticas de mérito se resumen en la Tabla 3.10.

Para el ensayo de selectividad se analizaron blancos de plasma de seis fuentes diferentes (4 plasmas normales, 1 plasma lipémico y 1 plasma hemolizado). Se inyectaron los 6 blancos de plasma descriptos, sin ARVs ni EI (extracto de blanco de plasma), con el agregado de ARVs (Extracto de blanco de plasma + ARVs correspondiente al nivel de cuantificación LIC) y con el agregado de EI (Extracto de blanco de plasma + EI). En ninguno de los casos se evidenció interferencias en los tiempos de retención de los analitos y del EI.

Las rectas de calibración se obtuvieron en condiciones optimizadas siguiendo la metodología propuesta. Los plasmas blancos se fortificaron con estándares de ARVs cubriendo el rango de concentraciones deseado (Tabla 3.9). EL LIC se definió como la concentración más baja de la recta de calibración que se pudo medir con exactitud y

precisión aceptable de acuerdo a los requisitos de autoridades sanitarias nacionales (ANMAT, 2006) e internacionales (Anvisa, 2003; USFDA, 2013).

Tabla 3.9: Datos experimentales de la recta de calibración para cuantificar ABC, 3TC, NFV y EFV en plasma humano por CPE con detección LC-MS/MS.

Nivel	V _{plasma} [μL]	V _{ST MIX} [μL]	V _{EI} [μL]	Concentración en plasma (ng.mL ⁻¹)			
				ABC	EFV	3TC	NFV
00	500	0	0	0	0	0	0
0	500	0	100	0	0	0	0
1	500	25 ^[2]	100	43	31	20	49
2	500	50 ^[2]	100	85	62	41	99
3	500	100 ^[2]	100	170	125	81	198
4	500	200 ^[2]	100	341	250	162	395
5	500	25 ^[1]	100	426	312	203	494
6	500	50 ^[1]	100	852	624	406	988
7	500	100 ^[1]	100	1704	1248	812	1976
8	500	200 ^[1]	100	3408	2496	1624	3952
9	500	400 ^[1]	100	6816	4992	3248	7904

Observaciones: [1] ST1 MIX: ABC 8,52 μg.mL⁻¹; EFV 6,24 μg.mL⁻¹; 3TC 4,06 μg.mL⁻¹; NFV 9,88 μg.mL⁻¹. [2] ST2 MIX: ABC 0,85 μg.mL⁻¹; EFV 0,62 μg.mL⁻¹; 3TC 0,41 μg.mL⁻¹; NFV 0,99 μg.mL⁻¹.

La relación de las áreas de los ARVs y EI en los estándares de calibración fueron proporcionales a la concentración de cada uno de los analitos. Las ecuaciones de regresión lineal con un factor de ponderación de 1/x (donde x = concentración) produjeron el mejor ajuste para la relación concentración-respuesta con coeficientes de correlación >0,99 para todos los ARVs en plasma (Gomes y col., 2008; Han y col., 2008). Las rectas de calibración mostraron linealidad satisfactoria dentro del rango de concentración: 43–6816, 125–4992, 81–3248 y 49–7904 ng.mL⁻¹ para ABC, AFV, 3TC y NFV, respectivamente.

El ensayo de exactitud y precisión intra e interdía se evaluó en tres replicados a tres niveles de concentración. EL CV% para cada nivel de concentración no superó el 15% excepto para el LIC, que fue < 20%.

Tabla 3.10: Cifras analíticas de mérito de CPE-LC-ESI-MS/MS para el análisis de ABC, EFV, 3TC y NFV en plasma humano.

Analito	ABC	EFV	3TC	NFV				
LIC (CV%)	43 (6,9)	125 (19,0)	81 (0,1)	49 (5,3)				
Rango lineal (ng.mL ⁻¹)	43 – 6816	125 – 4992	81 – 3248	49 – 7904				
Regresión lineal (Ponderación 1/x)	$y = 1087 + 74,3x$	$y = 74,8 + 1,70x$	$y = 63,9 + 2,14x$	$y = 2131 + 83,0x$				
Coficiente de correlación	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99				
	CC (ng.mL ⁻¹)	ER (%)	CC (ng.mL ⁻¹)	ER (%)	CC (ng.mL ⁻¹)	ER (%)	CC (ng.mL ⁻¹)	ER (%)
Veracidad Intra-día	85	-12	125	-17	81	-20	99	-8
	1704	6	1248	3	812	1	1976	1
	3408	8	2496	9	1624	4	3952	7
Veracidad Inter-día	85	-15	125	-11	81	-13	99	-6
	1704	-2	1248	-3	812	11	1976	3
	3408	1	2496	3	1624	12	3952	9

CC: Control de Calidad

La estabilidad de los ARVs en el plasma humano se evaluó a temperatura ambiente (6 h), post-procesamiento (12 h en inyector automático), después de tres ciclos de congelado-descongelado y a largo plazo (119 días a -20 °C). En la Tabla 3.11 se presentan los resultados de los ensayos de estabilidad para los analitos en estudio. Se consideró a los ARVs estables en plasma humano o extractos ya que el error relativo porcentual estuvo dentro de $\pm 15\%$ de su valor nominal.

Tabla 3.11: Estabilidad de los ARVs en plasma humano a diferentes condiciones.

Valor nominal de los CC (Bajo, Medio y Alto)		Temperatura ambiente (6 h)	Inyector automático (12 h)	Congelado- Descongelado (3 ciclos)	Largo plazo (119 días)
Analito	ng.mL ⁻¹	ER %	ER %	ER %	ER %
ABC	72	12,9	13,6	15,3	11,8
	3367	-4,7	9,4	14,4	8,7
	6266	-3,5	0,0	4,5	1,3
EFV	226	1,8	5,6	-2,9	9,4
	2259	2,8	7,6	3,8	2,1
	4518	6,4	0,6	7,1	3,9
3TC	78	0,8	1,6	6,0	2,8
	1756	-2,3	1,2	-1,7	-6,6
	3267	-6,6	-1,7	-6,5	-9,3
NFV	102	1,6	7,7	11,4	7,3
	3250	4,7	4,6	2,7	5,1
	6500	-2,7	3,7	-0,7	-4,4

3.5.4 Comparación de metodologías bioanalíticas

La metodología propuesta de CPE con detección por LC-MS/MS, desarrollada para el análisis múltiple de ARVs en muestras de plasma, presenta varias características que la hacen adecuada para el análisis de rutina. La Tabla 3.12 resume los métodos reportados para analizar ARVs en plasma humano. Las cifras analíticas de mérito satisfacen los requisitos de las directrices internacionales, por lo que la metodología bioanalítica es adecuada para los estudios de bioequivalencia. La técnica de CPE propuesta se puede utilizar en preparaciones discontinuas de muestras y puede ser llevada a cabo en 25 minutos. No incluye etapa de evaporación del solvente, ni requiere solventes tóxicos, usados regularmente para técnicas tradicionales, como LLE y SPE.

Tabla 3.12: Metodologías bioanalíticas para el análisis de ARVs en plasma humano.

Técnica instrumental	Analito	E	Plasma (μL)	Rango lineal (ng.mL^{-1})	CV % *	%R	Corrida (min)
HPLC-UV (Donnerer y col., 2003)	ABC					66	
	NFV	LLE	1000	200 – 10.000	< 8,0	51	n.d.
	EFV					54	
LC-MS/MS							
(Yadav, Gupta, y col., 2010)	ABC	LLE	100	30 – 9.318	< 10,8	87	2
HPLC-UV (Rezk y col., 2003)	ABC	SPE	800	10 – 10.000	< 7,6	> 97	40
	3TC						
LC-MS/MS (Nirogi y col., 2009)	EFV	SPE	100	20 – 2.000	< 8,4	54	4
LC-MS/MS							
(Rower, Klein, Bushman, y Anderson, 2012)	3TC	SPE	100	1 – 3.000	< 8,3	94	9
LC-MS/MS (Gomes y col., 2008)	ABC	SPE	200	100 – 7.000	< 7,6	59	2
	3TC			80 – 5.000	< 9,1	105	
LC-MS/MS**	ABC	CPE	500	43 – 6.816	< 9,2	90	4
	EFV			125 – 4.992	< 13,7	105	
	3TC			81 – 3.248	< 14,7	82	
	NFV			49 – 7.904	< 6,4	98	

Observaciones: E: Extracción; %R: Porcentaje de Recuperación; n.d.: no disponible; *: Se compararon los valores de precisión intra e inter día; **: metodología propuesta.

3.6 Conclusiones

Este trabajo presenta una contribución al campo de la química analítica, así como a disciplinas relacionadas incluyendo principalmente farmacología, bioquímica y medicina. Se propone una nueva aplicación del CPE para el análisis de ARVs en plasma humano por LC-MS/MS. El desarrollo sobre matrices complejas reales permitió una caracterización y optimización completa del procedimiento. La metodología bioanalítica propuesta fue desarrollada y validada para cuantificar ABC, EFV, 3TC y NFV en plasma humano cumpliendo con los requisitos de las guías de validación de métodos bioanalíticos, siendo adecuada para estudios farmacocinéticos de dichos ARVs, así como

para el monitoreo terapéutico de pacientes con VIH. Además de su rendimiento analítico, es importante señalar que la técnica de preparación de muestras propuesta es compatible con el medio ambiente lo cual coincide con las actuales tendencias de química verde.

4. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA BIOANALÍTICA DE SPE LC-MS/MS PARA CUANTIFICAR EFAVIRENZ, EMTRICITABINA Y TENOFOVIR EN PLASMA HUMANO: APLICACIÓN A UN ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD COMPARADA

4.1 Resumen

Se presenta una metodología bioanalítica optimizada y validada para la determinación cuantitativa y simultánea de Efavirenz (EFV), Emtricitabina (FTC) y Tenofovir (TFV) en plasma humano, cuya combinación se utiliza en formulaciones farmacéuticas para tratar pacientes con VIH. El método incluyó un procedimiento de extracción de fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de modo mixto Oasis® MCX y HPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem por electronebulización (LC-MS/MS) utilizando TFV-d₇ como EI. Bajo condiciones optimizadas, esta metodología analítica permitió trabajar dentro de un rango de concentración de 51 – 4.102 ng.mL⁻¹ para EFV, 51 – 4.106 ng.mL⁻¹ para FTC y 10 - 504 ng.mL⁻¹ para TFV. La veracidad y precisión fue determinada en cuatro niveles de controles de calidad para cada ARV con ER% ≤ 14,8, excepto en el límite de cuantificación el cual fue ≤ 19,7. Respecto del CV% fue ≤ 14,5 para los diferentes niveles de concentración excepto para el límite de cuantificación el cual fue ≤ 16,1. Los ARVs fueron estables en plasma humano a temperatura ambiente durante 4 h, post-procesamiento durante 13 h, después de tres ciclos de congelado-descongelado y a largo plazo (109 días a -20 °C).

Las características del método bioanalítico permitieron su aplicación en un estudio de farmacocinética comparada de EFV, FTC y TDF 600/200/300 mg respectivamente en voluntarios sanos, luego de administrar una dosis única de 600/200/300 mg de una combinación a dosis fija de EFV/FTC/TDF de la formulación de Estudio, con respecto al producto de Referencia, Atripla® de Gador S.A. Los resultados mostraron que el punto estimado y los IC del 90% para las proporciones correspondientes de C_{máx}, ABC_{0-196h} para EFV, ABC_{0-24h} para FTC, ABC_{0-48h} para TFV y ABC_{0-∞} estuvieron dentro del rango aceptable de bioequivalencia de 80 a 125% (p <0,05) para cada uno de los ARVs.

4.2 Introducción

El principal objetivo de la terapia antirretroviral altamente activa consiste en reducir la carga viral a un nivel lo más bajo posible por un periodo de tiempo más prologando. Para alcanzar estos objetivos, utilizando las drogas disponibles en el mercado, se administra un mínimo de tres compuestos: usualmente dos drogas nucleosídicas inhibidoras de la transcriptasa inversa y un inhibidor de proteasa o bien, un inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa (Maggiolo, 2007).

Los productos combinados de dosis fijas, para el tratamiento de VIH, actualmente se han comenzado a utilizar con el propósito de mejorar la adherencia de los pacientes, evitar la monoterapia y además disminuir el riesgo del desarrollo resistencia a las drogas. En algunos países se emplean productos combinados de Tenofovir Disoproxil Fumarato (TDF) con Emtricitabina (FTC) y Efavirenz (EFV) (Gallant y col., 2006; Thompson y col., 2015; USFDA, 2006).

4.2.1 Aspectos Farmacológicos de EFV, FTC y TDF.

EFV es un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo a los nucleósidos/nucleótidos (ITRNN) del virus humano de inmunodeficiencia adquirida tipo 1 (VIH-1). Su acción es a través de la inhibición no competitiva de la transcriptasa inversa del VIH-1, mientras que no posee efecto inhibitorio sobre la transcriptasa inversa del virus tipo 2 (VIH-2) (Maggiolo, 2007). En los primeros estudios sobre la monoterapia de corto plazo se observó una reducción considerable del ARN vírico plasmático, pero este medicamento se utiliza en combinación con otros fármacos eficaces. Se administra oralmente en forma de cápsulas o comprimidos en una dosis de 600 mg diarios en ayunas (Maggiolo, 2007; Martindale y Kathleen, 2009).

FTC es un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa análogo a Citosina, con actividad contra VIH-1 y el virus de la hepatitis B (VHB) (Martindale y Kathleen, 2009). FTC se fosforila por medio de enzimas celulares a la forma 5'-trifosfato de FTC, que es un inhibidor competitivo de la transcriptasa inversa del VIH-1, produciendo una interrupción de la cadena de ADN. FTC se administra oralmente en cápsulas en dosis diaria de 200 mg. Cuando se utiliza como monoterapia se produce rápidamente resistencia viral, por lo que siempre se utiliza junto a otros antiretrovirales (Maggiolo, 2007; Martindale y Kathleen, 2009).

TDF es convertido a TFV, un derivado del 5'-monofosfato de adenosina que carece de un anillo completo de ribosa. El TFV presenta actividad contra la transcriptasa inversa del VIH-1 y sobre la polimerasa VHB (Montoya, 2015). El TDF se hidroliza hasta generar TFV y luego las quinasas celulares lo fosforilan para formar su metabolito activo, Difosfato de Tenofovir. Este es un inhibidor competitivo de la transcriptasa inversa viral y se incorpora en el ADN viral para interrumpir la cadena, gracias a que posee un anillo incompleto ribosa. Pese a poseer un amplio espectro contra las polimerasas víricas, su afinidad por las polimerasas α , β y γ de ADN humano es reducida, lo que explica sus efectos adversos selectivos. El TDF se administra en forma oral. Una dosis de 300 mg de TDF equivale a 245 mg de Tenofovir Disoproxil y aproximadamente a 136 mg de TFV. Para el tratamiento de infecciones con VIH o Hepatitis B, usualmente se utilizan dosis de TDF 300 mg una vez al día junto a la comida (Maggiolo, 2007; Martindale y Kathleen, 2009).

Se requieren estudios de farmacocinética comparada entre dos productos farmacéuticos (Prueba y Referencia) para demostrar la bioequivalencia entre ambos. Los parámetros farmacocinéticos no sólo dependen de la formulación comercial, de la dosis administrada, sino también de la etnia de los voluntarios del estudio de bioequivalencia, las condiciones de ingesta de medicamentos, entre otros parámetros (Narang y col., 2005a, 2005b; Yadav, Singhal, y col., 2010). Un paso clave en la realización de un estudio de bioequivalencia es el desarrollo de metodologías analíticas para una determinación cuantitativa del ingrediente farmacéutico en las muestras biológicas seleccionadas con exactitud y especificidad (ANMAT, 2006; Anvisa, 2003; USFDA, 2013). Por lo tanto, el desarrollo de una metodología bioanalítica apropiada juega un papel importante para asegurar resultados fiables en los estudios de bioequivalencia. En este sentido, las cifras analíticas de mérito de la metodología bioanalítica son decisivas y deben contemplar la situación objeto de estudio. Diferentes métodos analíticos se informaron en la literatura para el seguimiento de los niveles plasmáticos de FTC (Blum y col., 2007; Gomes y col., 2008; Mathias y col., 2007; Nirogi y col., 2009), TFV (Podany, Sheldon, Grafelman, y Ohnmacht, 2015; Yadav, Singhal, y col., 2010) y EFV (Colombo y col., 2006; Fox y col., 2011). La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), es la técnica instrumental más prometedora para la determinación de ARVs, debido a su sensibilidad y selectividad. Sin embargo, el principal desafío al determinar la

concentración plasmática de TFV utilizando LC-MS/MS, es eludir los efectos de supresión iónica que se producen en la fuente de iones (Nirogi y col., 2009). Entre las técnicas de preparación de muestras informadas para la determinación de TFV por LC-MS/MS, SPE es la que conduce a una extracción y concentración eficiente de TFV disminuyendo los efectos de la matriz (Chiu y col., 2010; Nirogi y col., 2009; Podany y col., 2015). SPE también se ha utilizado para la cuantificación mediante LC-MS/MS de múltiples ARVs en muestras de plasma humano (Yadav, Singhal, y col., 2010).

4.3 Objetivo

- ✓ Desarrollar y validar una metodología bioanalítica basada en SPE LC-MS/MS para determinar EFV, FTC y TFV en plasma humano.
- ✓ Aplicar la metodología bioanalítica validada a muestras obtenidas en un estudio clínico de biodisponibilidad comparada de fármacos conteniendo EFV/FTC/TDF.
- ✓ Analizar la farmacocinética comparada de EFV, FTC y TFV en voluntarios sanos, luego de administrar una dosis única de 600/200/300 mg de una combinación a dosis fija de EFV/FTC/TDF de la formulación de Estudio de industria nacional, con respecto al producto de Referencia, Atripla® de Gador S.A., que contiene la misma cantidad de Principios Activos.

4.4 Experimental

Para el desarrollo y validación de la metodología bioanalítica se utilizaron, los reactivos, estándares y equipamiento presentados en Tabla 4.1,

Tabla 4.2 y Tabla 4.3 respectivamente.

Tabla 4.1: Reactivos.

Componente	Marca	Lote
ACN - grado HPLC	Carlo Erba	D5C058235C
H ₂ O - grado HPLC	Merck	Z0340233
MeOH - grado HPLC	Carlo Erba	V4A548174A
Acetato de Amonio	Merck	A0379116212

Tabla 4.2: Estándares analíticos.

Estándar	Propósito	Calidad	Pureza	Lote
EFV	Analito a cuantificar	Primario-USP®	99,7%	G0L369
FTC	Analito a cuantificar	Primario-USP®	99,7%	F0J163
TFV	Analito a cuantificar	Primario-USP®	100,0%	F0J005
TFV-d ₇	EI	Primario-TRC	98,4%	1911-079A4
TFV-d ₇	EI	Primario-TLC	98,3%	1299-001A3

Tabla 4.3: Equipamiento y materiales generales.

Componente	Marca	Modelo
Cromatógrafo líquido	Shimadzu	LC 20AD xr
Desgasificador	Shimadzu	DGU-20A3
Inyector automático	Shimadzu	SIL-20A xr
Columna cromatográfica	Thermo	Hypersil GOLD 100 × 2,1 mm, 3,0 μm
Espectrómetro de masas	AB Sciex	API 3200
Software	Analyst	Versión 1.5.2
Vortex	Boeco	V1 Plus
Centrífuga	Eppendorf	5702R
Colector de Vacío para SPE	Varian	-
Micropipetas automáticas	Brand	P100; P200; P1000 y P5000

Para los ensayos de especificidad, linealidad, controles de calidad, recuperación y preparación de controles de calidad, se utilizaron muestras blanco de plasma humano de 30 individuos, según protocolo correspondiente a Dominguezlab S.R.L. tal como se indica en la Tabla 2.4.

Tabla 4.4: Material Biológico.

Componente	Fuente	Lote
Plasma Humano Normal	Dominguezlab	PL-Normal-CVD-P1-20
Plasma Humano Lipémico	Dominguezlab	PL-Lipémico-CVD-P1-5
Plasma Humano Hemolizado	Dominguezlab	PL-Hemolizado-CVD-P1-5

4.4.1 Metodología de trabajo

En lo que respecta a la parte analítica se desarrolló y validó una metodología bioanalítica por SPE con detección por LC-MS/MS para cuantificar EFV, FTC y TFV en plasma humano utilizando TFV-d₇ como EI. Composición y flujo de la fase móvil, características de la columna cromatográfica, relación de solventes en el vial de HPLC, volumen de inyección y condiciones del espectrómetro de masas fueron los parámetros a tener en cuenta en el desarrollo con el fin de obtener la mejor señal de los ARVs así como también disponer de un tiempo de corrida apropiado para analizar con exactitud y precisión muchas muestras en cada secuencia cromatográfica. Se optimizaron las condiciones de SPE. La metodología bioanalítica validada fue aplicada al análisis de las muestras plasmáticas de voluntarios y monitoreada sistemáticamente dentro de cada secuencia analítica.

En cuanto al estudio clínico la metodología de trabajo se basó en proponer el diseño óptimo, el adecuado número de voluntarios y el correcto muestreo con el objeto de poder describir la curva farmacocinética de los diferentes ARVs en plasma humano, así como también demostrar la intercambiabilidad de las formulaciones evaluadas.

A partir de la cuantificación de la concentración plasmática de EFV a los distintos tiempos de muestreo, se calcularon los parámetros farmacocinéticos de acuerdo a las Disposiciones N° 3185/99, 5040/06 y 1746/07 de ANMAT, por un método no compartimental utilizando el programa WinNonlin Professional v.6.02 (Pharsight, Mountain View, CA). Los parámetros calculados fueron: ABC_{0-t} ; $ABC_{0-\infty}$; $C_{m\acute{a}x}$; $T_{m\acute{a}x}$; k_{el} y $T_{1/2\ elim}$.

Los resultados farmacocinéticos descriptivos fueron expresados como la media (\pm desviación estándar) y media geométrica. Se presentaron los resultados individuales de cada voluntario y cada formulación y también los promedios para cada formulación.

Se calcularon los cocientes de los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ para evaluar la bioequivalencia, considerando un intervalo de confianza de 90% a través de la Prueba *t*. El análisis de la variancia (ANOVA) se utilizó para evaluar factores de secuencia, período y tratamiento, considerando la determinación de la menor diferencia significativa ($p < 0,05$).

4.4.2 Formulaciones en estudio

La formulación de Prueba, así como también la formulación de Referencia (Atripla[®]) se presentan en forma de comprimidos recubiertos que contienen 600 mg de EFV, 200 mg de FTC y 300 mg de Tenofovir Disoproxil (como fumarato).

4.4.3 Aspectos farmacocinéticos

La biodisponibilidad oral del EFV es buena (45-66%). Luego de la administración de dosis entre 100 y 1600 mg de EFV a voluntarios sanos no infectados, las concentraciones plasmáticas máximas ($C_{m\acute{a}x}$) rondan entre 1.6 y 9.1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Maggiolo, 2009; Martindale y Kathleen, 2009). EFV se absorbe bastante bien en el aparato digestivo y alcanza su concentración plasmática máxima en las primeras 5 h. Su absorción disminuye al aumentar la dosis. Su biodisponibilidad (ABC) aumenta 22% con los alimentos que contienen abundante grasa y más de 99% se fija a las proteínas plasmáticas. Se recomienda tomarlo con el estómago vacío al acostarse, para reducir los efectos adversos. El efavirenz se elimina por metabolismo oxidativo, principalmente a través de CYP2B6 y en menor grado de CYP3A4. El fármaco original no se excreta por vía renal. Se elimina lentamente y su semivida de eliminación es de 40 a 55 h. De esta manera puede administrarse una sola vez al día (Flexner, 2007).

FTC es rápidamente absorbida a través del tracto gastrointestinal luego de dosis orales, alcanzando concentraciones máximas 1-2 horas post-administración. Se ha reportado que presenta una biodisponibilidad de 93%. La unión a proteínas por parte de FTC se ha reportado menor al 4%, es poco metabolizada y es excretada en gran parte inalterada a través de la orina, y en menor medida a través de las heces. La vida media de eliminación es de 10 horas (Martindale y Kathleen, 2009).

TDF es rápidamente absorbido, con $T_{m\acute{a}x}$ de aproximadamente 1-2 horas, y es rápidamente convertido a TFV. Los niveles séricos de TFV disminuyen en forma bifásica con $t_{1/2}$ de eliminación entre 12-15 horas, permitiendo regímenes de una dosis diaria. Las comidas con un alto tenor graso poseen un impacto significativo sobre la biodisponibilidad, incrementándose en aproximadamente un 30-40%. Las comidas ricas en grasas originan un retraso en el $T_{m\acute{a}x}$ de aproximadamente 1 hora e incrementan el $C_{m\acute{a}x}$ en un 14%; por lo que se recomienda la administración de TDF junto con las comidas. TFV no se fija excesivamente a las proteínas plasmáticas (0,7% en plasma humano) y se distribuye ampliamente a los tejidos corporales, particularmente riñón e

hígado. Luego de la absorción, el TDF se convierte en TFV el cual es posteriormente metabolizado (intracelularmente) a su metabolito activo, Tenofovir Difosfato. TFV se excreta principalmente en orina por secreción tubular activa y filtración glomerular. Puede ser removido por hemodiálisis (Maggiolo, 2007; Martindale y Kathleen, 2009).

4.4.4 Diseño del estudio

El Estudio fue conducido por personal entrenado en Normas de Buenas Prácticas Clínicas de acuerdo a la Conferencia Internacional de Armonización (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996), declaración de Helsinski (AMM, 2013) y las Disposiciones N° 3311/2001, 5040/06, 1746/07, 6677/10 de ANMAT.

El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Clínica de DominguezLab S.R.L, ubicado en la calle Moussy 41, Paraná, Provincia de Entre Ríos, Argentina.

Se incorporaron voluntarios que reunieron todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión según protocolo “PRO-BEQ-EET-002-V.01” propiedad intelectual de Dominguelab S.R.L.

El estudio clínico contó con la aprobación del Comité de Ética en Investigación Institucional de DominguezLab (CEIID), el cual responde a las normativas internacionales y se contó con el Consentimiento Informado firmado por los voluntarios para su participación en el Protocolo y comienzo del Estudio. La ANMAT fue informada sobre la intención y comienzo del Estudio, así como también de su finalización.

La investigación consistió en un estudio abierto, aleatorizado, cruzado, con dos períodos y dos secuencias. En el estudio los voluntarios recibieron en cada período la EFV/FTC/TDF 600/200/300 mg de la formulación de Estudio, o la formulación de Referencia, Atripla® de Gador S.A.

El tamaño muestral se calculó de acuerdo a la fórmula propuesta por Marzo y Balant (1995) y datos previos reportados en literatura científica (Akhil y col., 2014; Marier y col., 2006; Mathias y col., 2007). Se seleccionaron 24 voluntarios masculinos sanos y el período de lavado entre las dos internaciones obedeció a un intervalo mínimo de 5 a 7 vidas medias de la droga en estudio. Debido a que el EFV presenta un $t_{1/2} = 52 - 76$ horas (Martindale y Kathleen, 2009), se planificó un intervalo de por lo menos 28 días entre los dos períodos. Se indicó a los voluntarios que durante éste período, no debía consumir ninguna medicación sin previo aviso al Investigador Principal del Estudio, a no ser que se produzca una situación de riesgo para la vida del voluntario.

4.4.5 Extracción, manejo y almacenamiento de las muestras biológicas

Teniendo en cuenta los aspectos farmacocinéticos y con el objeto de poder describir la farmacocinética de los 3 ARVs, se extrajeron aproximadamente 4 mL de sangre venosa a los siguientes tiempos: 0 pre-dosis; 15 min., 30 min., 45 min., 1 h, 1¹⁵ h, 1³⁰ h, 2 h, 2³⁰ h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h, 144 h y 192 horas post-dosis considerando como tiempo cero el momento de la administración de la formulación. Se documentó el tiempo real de extracción el cual se utilizó en el análisis de los resultados. Luego se centrifugó a 1500 g, durante cinco minutos y una vez separado el plasma con micropipetas, se dispuso en dos crioviales de polipropileno de 2 mL (muestra y contramuestra) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

4.5 Resultados y Discusión

4.5.1 Desarrollo de la metodología bioanalítica

La optimización de las condiciones de trabajo en el espectrómetro de masas (MS/MS) se llevó a cabo mediante infusión directa con bomba de jeringa de soluciones estándares (1 µg.mL⁻¹) de cada analito en la fuente ESI a un flujo de 20 µL/min utilizando una bomba de jeringa incorporada en el equipo. Las características químicas de los compuestos analizados se detallan en la Tabla 4.5 (Abdelhay, Gazy, Shaalan, y Ashour, 2013; Agrahari y Youan, 2012; Rabel, Maurin, Rowe, y Hussain, 1996).

Se seleccionó el ión base de cada ARV trabajando en modo “escaneo completo” en el rango de 50 a 700 *m/z*. En todos los casos la mejor señal se obtuvo trabajando en modo positivo [M + H]⁺. Se optimizaron los diferentes potenciales del instrumento para obtener la mayor señal de los iones producto proveniente de los diferentes picos base. En la Tabla 4.6 se presentan las condiciones del espectrómetro para trabajar en modo MRM⁺ y llevar a cabo el análisis cuantitativo de los analitos en estudio. Las demás condiciones operativas fueron optimizadas en conjunto con la cromatografía, siendo las mismas: temperatura de la fuente 100 °C, tiempo de permanencia 250 ms, voltaje en la aguja del nebulización de iones 5500 V, presión del gas de nebulización (GS1:N₂) 50 psi y presión del gas cortina 10 psi, presión del gas de colisión (N₂) 8 psi, presión y temperatura del gas de secado (GS2:N₂) 30 psi y 600 °C.

Tabla 4.5: Información físico-química de EFV, FTC y TFV.

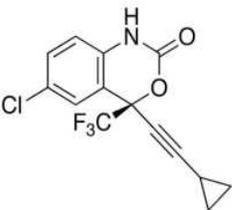
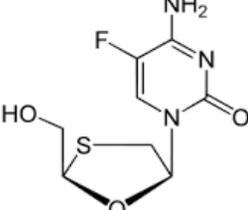
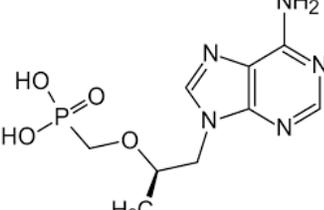
Analito	EFV	FTC	TFV
Estructura Química			
CAS	154598-52-4	143491-57-0	147127-20-6
Fórmula Molecular	C ₁₄ H ₉ ClF ₃ NO ₂	C ₈ H ₁₀ N ₃ FO ₃ S	C ₉ H ₁₄ N ₅ O ₄ P
Masa molecular (g.mol ⁻¹)	315,7	247,2	287,2
pK _a	10,2	2,6	3,8 y 6,7
Solubilidad en H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,009	2,0	1,9

Tabla 4.6: Parámetros del MS/MS para cuantificar EFV, FTC, TFV y TFV-d7.

Analito	Q1→Q3 (m/z)	EP (Volts)	DP (Volts)	CEP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
EFV	316,0→244,4	10	55	28	30	1,8
	<u>316,0→53,2</u>					
FTC	<u>248,1→130,0</u>	5	24	21	35	2,5
	248,1→113,0					
TFV	<u>288,1→176,1</u>	8	62	22	39	2,2
	288,1→159,1					
TFV-d7	<u>295,1→183,5</u>	10	45	18	40	3,0

EP: Potencial de entrada; DP: Potencial de desglose; CEP: Potencial de entrada a la celda de colisión; CE: Energía de colisión; CXP: Potencial de salida de la celda de colisión. La transición de cuantificación está subrayada.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en modo gradiente, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7: Condiciones cromatográficas para cuantificar EFV, FTC y TFV en plasma humano por LC-MS/MS utilizando TFV-d7 como EI.

Parámetro	Descripción		
Fase Móvil	A: MeOH:H ₂ O (97:3). B: MeOH:ACN:Acetato de amonio 10 mM (33:22:45).		
Gradiente	Tiempo	Bomba	Flujo (mL.min ⁻¹)
	0	B	0,15
	1,80	A	0
	2,20	A	0,25
	2,50	B	0,25
	2,70	B	0,15
	5,00	A	0,25
	5,10	A	0
Columna Analítica	Thermo, Hypersil GOLD 100 × 2,1 mm, 3,0 μm		
Temperatura Columna (°C)	40		
Volumen inyección (μL)	25		
Tiempo de corrida (min)	8,5		
Tiempos de retención (min)	EFV: 4,17		
	FTC: 2,00		
	TFV: 1,85		
	NFV-d7: 1,85		

4.5.2 Metodología de preparación de recta de calibración, CC y muestras SPE

- ✓ En un tubo de 5 mL se colocaron 700 μL de plasma.
- ✓ Se agregaron 1500 μL de HCl 0,1 N.
- ✓ Se adicionó el volumen de ST1 mix EFV+EMT y ST1 TFV correspondiente a cada nivel, según la Tabla 4.8.
- ✓ Se agregaron 100 μL de ST1 de EI a cada Nivel.
- ✓ Se colocó el volumen de H₂O HPLC a cada nivel según Tabla 4.8.
- ✓ Cada tubo se agitó en vórtex durante 10 segundos y se centrifugó a 3000 x g por 1 minuto.
- ✓ Las muestras incógnitas se procesaron de igual forma que el Nivel 0 de la recta de calibración.
- ✓ Cada preparación se sembró en los cartuchos previamente acondicionados

Tabla 4.8: Parámetros experimentales de la recta de calibración de EFV, FTC y TFV en plasma humano.

Nivel	V Plasma (μL)	V _{HCL} 0,1N (μL)	V _{ST1 Mix} EFV + EMT (μL)	V _{ST1} TFV (μL)	V _{ST1} EI (μL)	V _{H2O} (μL)	C _{EFV en} Plasma ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C _{FTC en} Plasma ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C _{TFV en} Plasma ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
BPL	700	1500	0	0	0	1400	0	0	0
Nivel 0	700	1500	0	0	100	1300	0	0	0
Nivel 1	700	1500	10	10	100	1280	51,3	51,3	10,1
Nivel 2	700	1500	25	25	100	1250	128,2	128,3	25,2
Nivel 3	700	1500	50	50	100	1200	256,4	256,6	50,4
Nivel 4	700	1500	100	75	100	1125	512,7	513,3	75,6
Nivel 5	700	1500	200	100	100	100	1025,5	1026,5	100,8
Nivel 6	700	1500	300	200	100	800	1538,2	1539,8	201,6
Nivel 7	700	1500	400	300	100	600	2051,0	2053,0	302,5
Nivel 8	700	1500	600	400	100	300	3076,5	3079,5	403,3
Nivel 9	700	1500	800	500	100	0	4101,9	4106,1	504,1

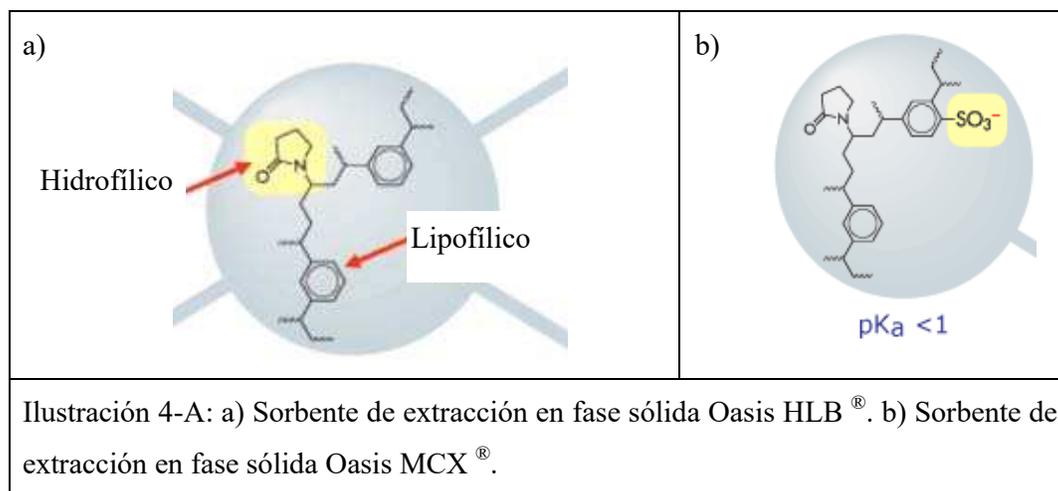
Observaciones: ST1mix EFV+FTC: $3,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ST1 TFV: $0,75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ST1 TFV-d7: $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.5.2.1 Extracción en fase sólida

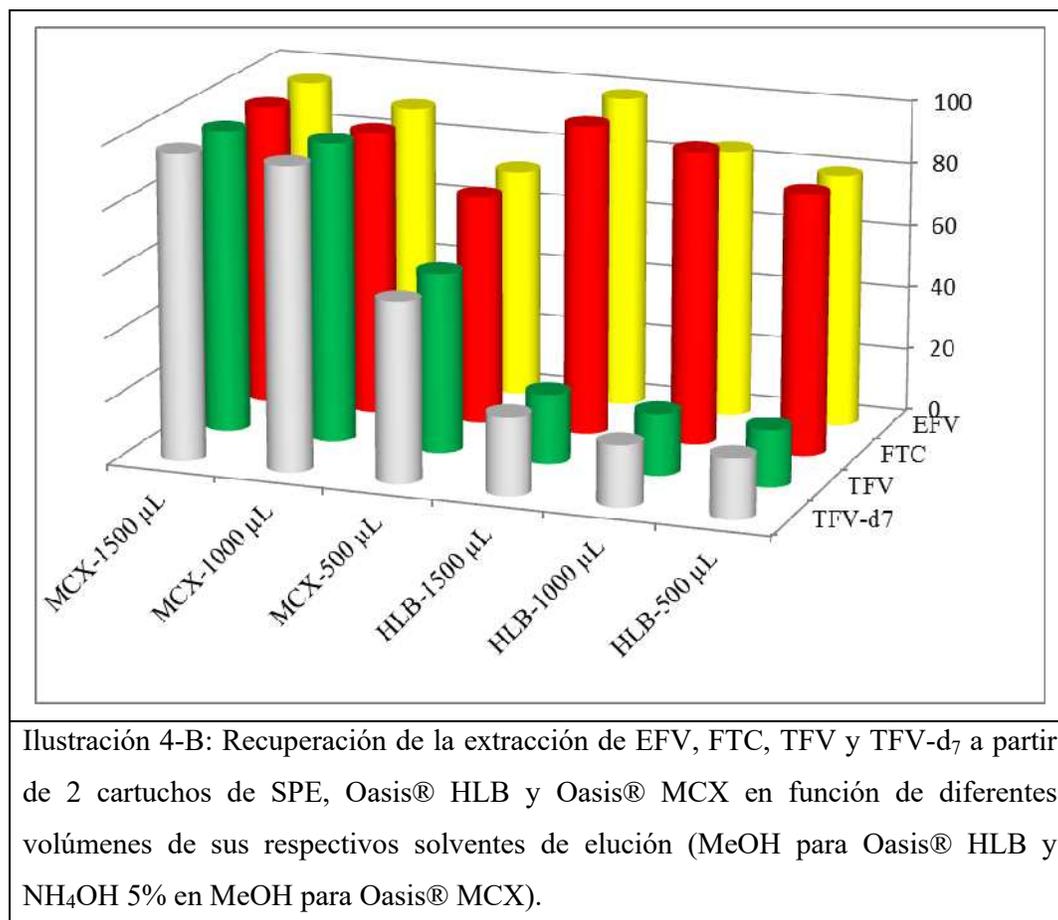
En la técnica de preparación de muestra, se evaluó la recuperación de los analitos después de la extracción en fase sólida comparando cada área del pico cromatográfico en plasma, con los blancos de muestra procesados y fortificados con soluciones de trabajo de cada ARV. Los cartuchos Oasis® HLB (Waters corporation, 2014) fueron desarrollados para la extracción de una amplia gama de compuestos ácidos, básicos y neutros de diversas matrices usando un protocolo simple y genérico.

En estas condiciones, diferentes moléculas presentes en la muestra de plasma también se retienen y pueden co-eluirse conjuntamente con los analitos en la etapa de elución. Por otra parte, los cartuchos Oasis® MCX (Waters corporation, 2014) contienen un sorbente polimérico de modo mixto que ha sido diseñado para lograr una mayor selectividad para la extracción de compuestos básicos a través de sus grupos de intercambio catiónico. Por lo tanto, incorporamos en nuestro método el paso a través de un cartucho Oasis® MCX de modo mixto para la limpieza de los extractos de muestra. Los concomitantes de la muestra se minimizaron durante la etapa de lavado y el análisis

del eluido de las etapas de lavado no mostró pérdida significativa de los analitos. En la Ilustración 4-A se presentan la estructura de los sorbentes contenidos en los cartuchos de SPE.



La Ilustración 4-B muestra las recuperaciones de extracción de FTC, 3TC, TFV y TFV-d₇ para dos cartuchos de SPE diferentes, Oasis[®] HLB y Oasis[®] MCX (ambos de 3 cm³ y 60 mg) y los respectivos volúmenes de eluyentes utilizados.



La recuperación de todos los ARVs aumentó a medida que aumentaba el volumen de eluyente. Para TFV y TFV-d₇, se obtuvo la respuesta analítica más alta para el cartucho Oasis® MCX. La baja respuesta analítica para TFV en los cartuchos HLB pudo deberse a su baja afinidad por la fase sorbente. El cartucho Oasis® MCX minimizó el efecto matriz, llegó a la sensibilidad deseada y tuvo recuperación consistente. Se optó por los cartuchos Oasis® MCX utilizando 2 mL de solvente de elución (1 mL de Hidróxido de amonio al 5% en MeOH seguido de 1 mL de MeOH) asegurando de esta manera la elución de EFV y reduciendo la cantidad de hidróxido de amonio.

La SPE se optimizó de manera de llegar a los límites de cuantificación deseados y teniendo en cuenta de que los volúmenes utilizados sean apropiados en función de la muestra disponible y del material existente en el laboratorio. En la Ilustración 4-C se presenta el sistema utilizado para realizar el proceso de SPE.



Ilustración 4-C: Imagen del colector de vacío (Manifold VARIAN) utilizado para el proceso de extracción en fase sólida.

A continuación, se detallan los pasos seguidos en la técnica de SPE para cuantificar EFV, FTC y TFV en plasma humano por LC-MS/MS:

- a) Se colocaron los cartuchos de SPE MCX en colector de vacío.

- b) Se acondicionaron con 3 mL de MeOH seguido de 3 mL de H₂O ultrapura grado HPLC.
- c) Se sembraron los cartuchos con los tubos que fueron centrifugados.
- d) Se lavaron los cartuchos con 1 mL de HCL 0,2 N.
- e) Se realizó un segundo lavado con 1 mL de H₂O:MeOH (75:25).
- f) Se secaron los cartuchos aplicando vacío al colector.
- g) Se colocaron tubos nuevos de 5 mL en la gradilla del colector y se eluyeron los cartuchos con 1 mL de MeOH.
- h) Se eluyeron nuevamente con 1 mL de hidróxido de amonio al 5% en MeOH.
- i) Se secaron nuevamente los cartuchos aplicando vacío.
- j) Se evaporó a sequedad con N₂.
- k) Se reconstituyeron con 1 mL de ACN:H₂O (50:50) y se agitaron en vórtex durante 30 segundos.
- l) Se colocaron en viales de HPLC y se inyectaron en el cromatógrafo.

4.5.3 Resultados de la validación del método analítico

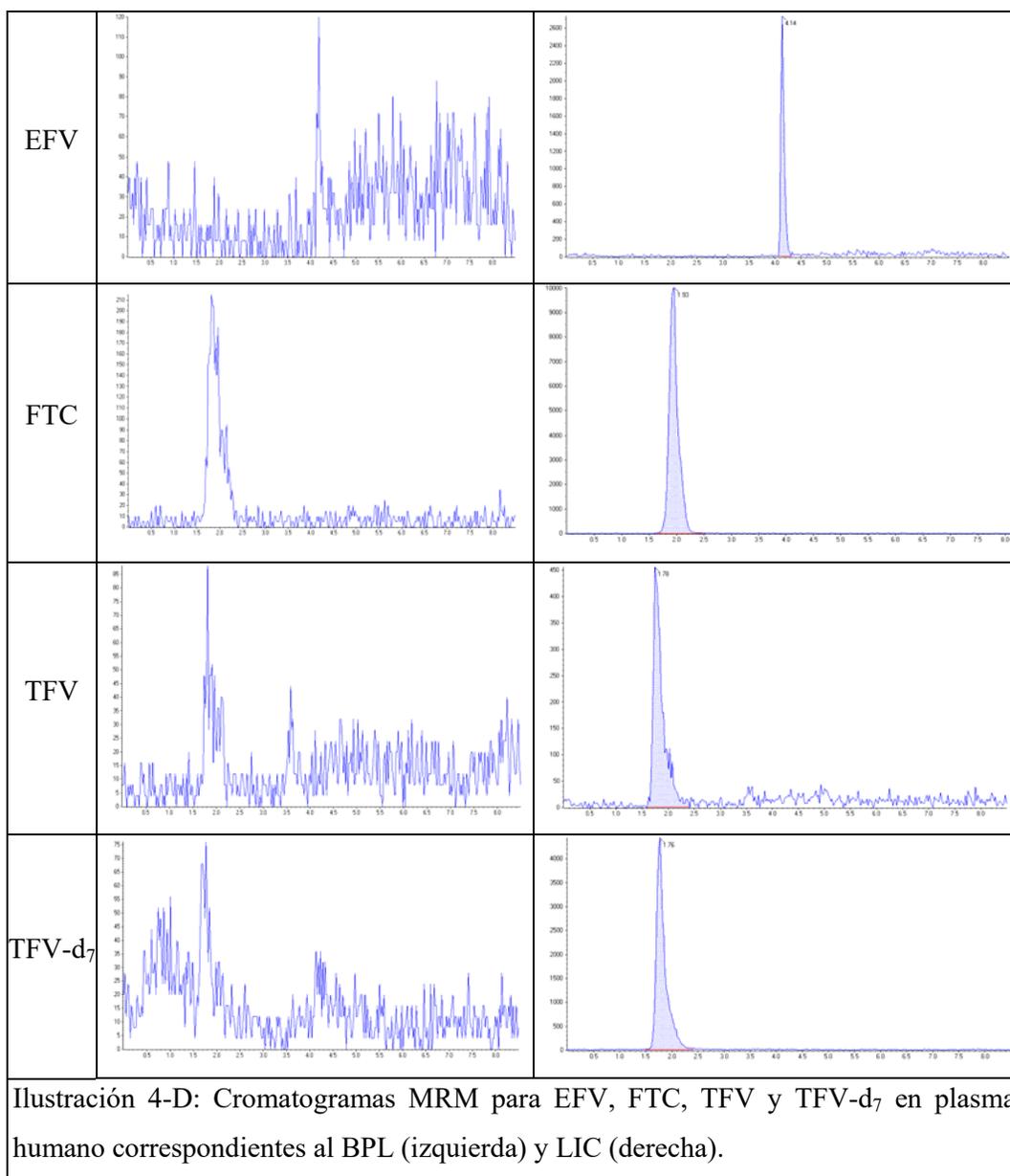
Los parámetros evaluados en la validación de la metodología bioanalítica fueron: efecto arrastre, selectividad; linealidad, exactitud y precisión intra e interdía, efecto matriz normalizado, estabilidad del analito en muestras fortificadas. A continuación, se detallan los resultados de cada uno de los parámetros evaluados.

4.5.3.1 Efecto arrastre

No se observaron interferencias en los tiempos de retención de los analitos así como tampoco en el de TFV-d₇.

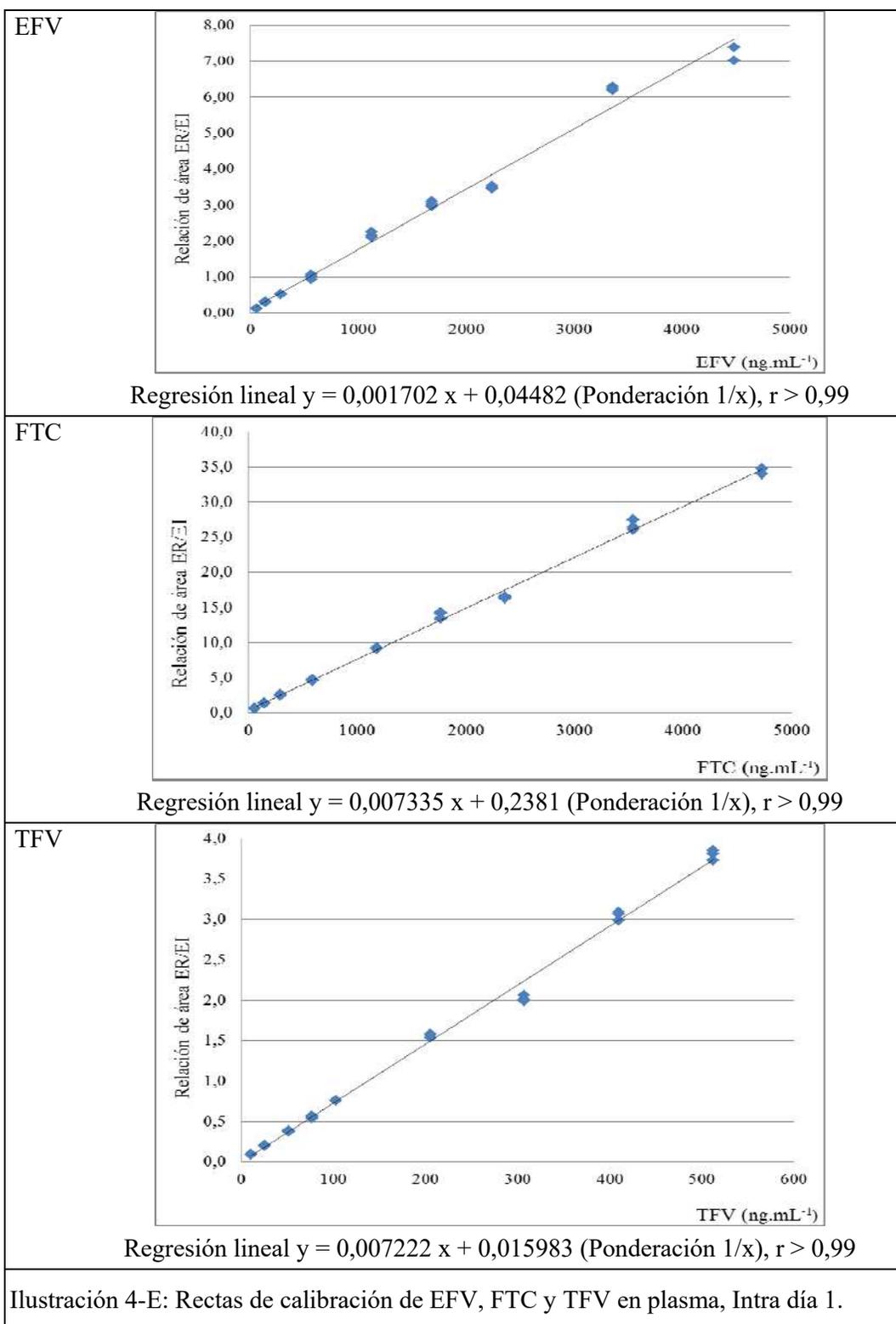
4.5.3.2 Especificidad

Cada blanco de muestra, descrita en la Tabla 4.4, se ensayó para determinar la interferencia usando el procedimiento de extracción propuesto y las condiciones cromatográficas. No se encontraron interferencias significativas en el tiempo de retención del fármaco, o EI, como se muestra en los cromatogramas presentados en la Ilustración 4-D siendo en todas las transiciones el área en los t_R de cada analito inferior al 20% respecto del área en el LIC. La especificidad también se aseguró en las diferentes fuentes de plasma (normal, lipémico y hemolizado).



4.5.3.3 Rango lineal

La recta de calibración se preparó sobre blanco de plasma fortificado con soluciones de trabajo de ARVs y EI cubriendo el rango esperado de concentraciones a cuantificar tal como se indica en la Tabla 4.8. La relación de las áreas de los analitos respecto de TFV-d₇ en los estándares de calibración fue proporcional a la concentración en plasma humano en el rango de 56 – 4.483 ng.mL⁻¹ para EFV, 59 – 4.726 ng.mL⁻¹ para FTC y 10 -512 ng.mL⁻¹ para TFV. Las rectas de calibración se obtuvieron mediante regresión lineal por mínimos cuadrados con coeficientes de correlación mayores a 0,99. En la Ilustración 4-E se presentan las rectas de calibración de validación Intra día 1.



4.5.3.4 Precisión y veracidad intra e inter día

Para evaluar la veracidad y precisión se prepararon controles de calidad (CC) en cinco niveles de concentración: LIC, bajo, medio, alto y dilución para. Los CC se

prepararon fortificando volúmenes adecuados de plasma blanco con volúmenes adecuados de ST de cada uno de los ARVs. Se homogeneizaron, se tomaron alícuotas de 700 μL , se trasvasaron a crioviales y se almacenaron en las mismas condiciones a las cuales se almacenaron las muestras biológicas hasta que el ensayo lo requirió. Las concentraciones de cada uno de ellos se indican en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9: Controles de Calidad de EFV, FTC y TFV.

Nivel	C_{EFV} ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C_{EMT} ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C_{TFV} ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
CC LIC	54,3	57,4	10,3
CC Bajo	135,7	143,5	26,8
CC Medio	2010,0	2125,7	257,6
CC Alto	3617,9	3826,3	472,3
CC Dilución	6967,8	6377,2	763,3

El ER% para todos los CC de los ARVs fue $\leq 14,8$, excepto en el límite de cuantificación el cual fue $\leq 19,7$. Respecto del CV% fue $\leq 14,5$ para los diferentes niveles de concentración excepto en el límite de cuantificación el cual fue $\leq 16,1$. Los resultados de veracidad y precisión estuvieron dentro del criterio de aceptación establecido por ANMAT (ANMAT, 2005) y por guías internacionales de validación de métodos bioanalíticos (Anvisa, 2003; USFDA, 2001).

4.5.3.5 Efecto matriz normalizado

El efecto matriz se realizó sobre 3 fuentes de plasma normal, 3 lipémicas y 3 hemolizadas. El ensayo se llevó a cabo tal como se describió en 1.3.4.7. Los CV% fueron 9,3% para EFV, 11,1% para FTC y 7,5% para TFV. Además de que el efecto matriz estuvo dentro del criterio de aceptación (CV% < 15) se apreció que las relaciones de áreas obtenidas a partir de los CC respecto de los mismos niveles preparados en H_2O no fueron demasiado diferentes y esto se debió a que las muestras fueron sometidas a un buen proceso de limpieza atribuible al uso de SPE.

4.5.3.6 Estabilidad en matriz

La estabilidad de los ARVs en plasma humano se evaluó a temperatura ambiente (4 h), post-procesamiento (13 h en inyector automático), después de tres ciclos de congelado-descongelado y a largo plazo (109 días a $-20\text{ }^\circ\text{C}$). Se consideró a los ARVs estables en plasma humano en las diferentes condiciones evaluadas ya que el error

relativo porcentual estuvo dentro de $\pm 15\%$ de su valor nominal. En la Tabla 4.10 se presentan los resultados de los ensayos de estabilidad para los analitos en estudio.

Tabla 4.10: Estabilidad de los ARVs en plasma humana a diferentes condiciones.

Valor nominal de los CC (Bajo, Medio y Alto)		Temperatura ambiente (4 h)	Inyector automático (13 h)	Congelado-Descongelado (3 ciclos)	Largo plazo (109 días)
Analito	ng.mL ⁻¹	ER %	ER %	ER %	ER %
EFV	135,7	-3,1	0,0	-7,1	-9,2
	2010,0	-12,8	-5,4	-2,6	-6,6
	3617,9	-7,7	-9,9	1,4	10,8
FTC	143,5	-8,4	3,0	-10,9	-8,9
	2125,7	11,0	11,3	4,5	-2,8
	3826,3	5,8	13,2	1,6	-6,1
TFV	26,8	1,3	-0,2	2,8	-1,2
	257,6	-2,7	5,1	-3,5	-1,7
	472,3	-7,5	-1,3	-6,6	-6,0

4.5.4 Resultados del estudio clínico

La investigación consistió en un estudio abierto a dosis única de 600/200/300 mg de EFV/FTC/TDF, respectivamente, en voluntarios sanos, aleatorizado, cruzado, pareado, balanceado con dos períodos, dos secuencias y con un período de lavado de 28 días. En cada período los voluntarios recibieron la formulación de Estudio comprimidos recubiertos 600/200/300 mg de un laboratorio farmacéutico nacional o la formulación de Referencia (R), Atripla® comprimidos recubiertos 600/200/300 mg de Gador S.A.

Los voluntarios 8, 10, 18, 20, 22 y 24 abandonaron el estudio por diferentes razones y fueron reemplazados por otros voluntarios (25, 26, 27, 28, 29 y 30). Los datos antropométricos correspondiente a los 30 voluntarios fueron: edad $25,6 \pm 6,8$ años, peso $73,4 \pm 9,7$ kg y altura $1,7 \pm 0,1$ m. Si bien ambas formulaciones fueron bien toleradas se detectaron algunos eventos adversos no serios como ser náuseas y vómitos. Luego de la extracción de cada una de las muestras, se separó el plasma y se colocaron en el freezer a -20 °C hasta su posterior análisis. Las muestras fueron analizadas en 17 secuencias cromatográficas las cuales estuvieron conformadas por los puntos de la recta de calibración, las muestras de los 2 períodos del voluntario seguida de controles de calidad los cuales se utilizaron para aceptar o rechazar la secuencia analítica.

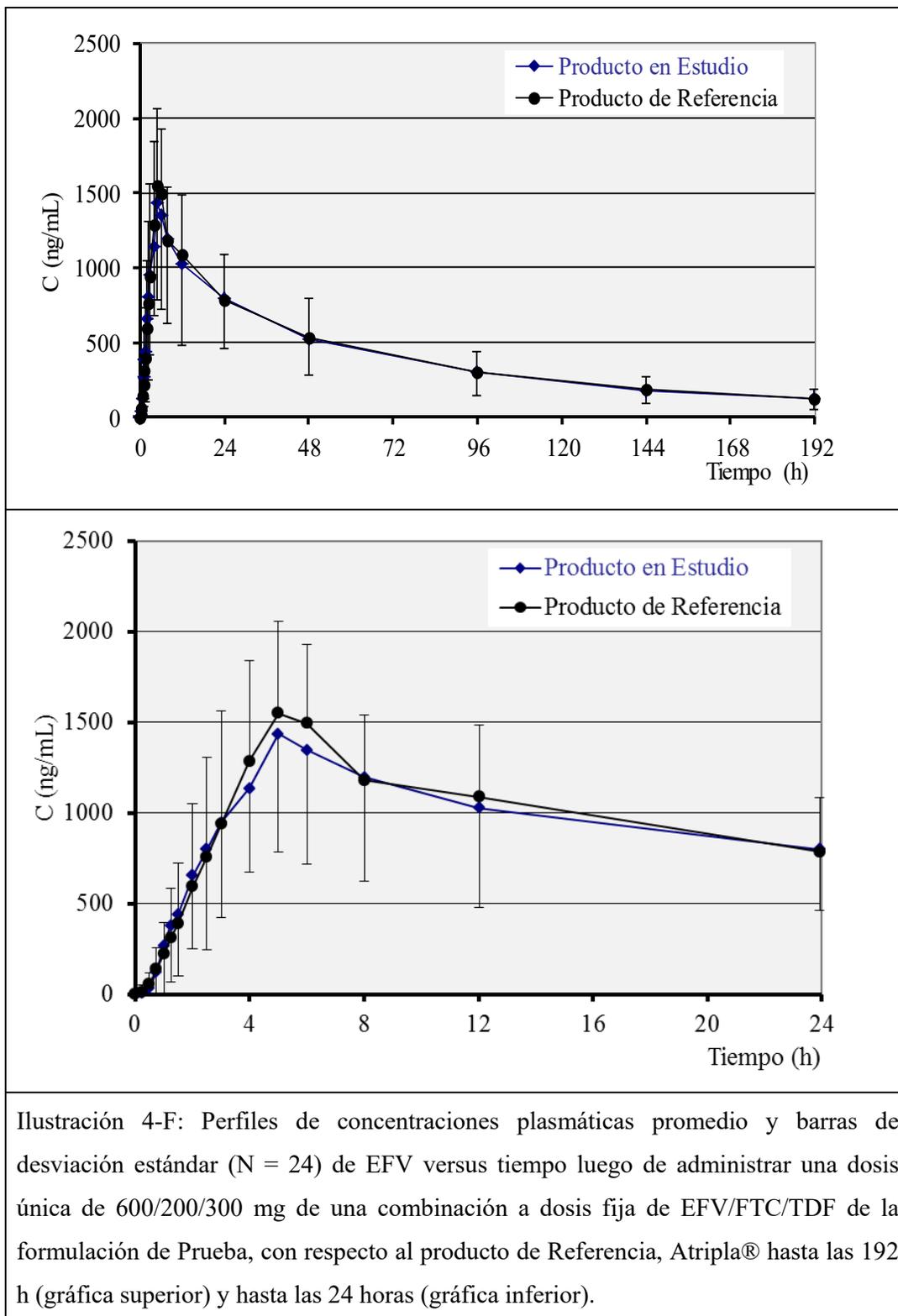
4.5.4.1 Resultados farmacocinéticos para EFV

A partir de las concentraciones plasmáticas de EFV se determinaron los diferentes parámetros farmacocinéticos tal como se puede apreciar en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11: Parámetros Farmacocinéticos de EFV para cada Voluntario.

Sujeto	$C_{\text{máx}}$ (ng.mL ⁻¹)		$T_{\text{máx}}$ (h)		K_e (h ⁻¹)		$T_{1/2}$ (h)		$ABC_{0-192\text{ h}}$ (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)		$ABC_{0-\infty}$ (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	
	E	R	E	R	E	R	E	R	E	R	E	R
1	1631	1615	8,0	5,0	0,0083	0,0095	84	73	76979	63629	100458	73739
2	1618	2079	5,0	5,0	0,0072	0,0079	96	88	64016	97062	85866	121488
3	949	1655	5,0	6,0	0,0097	0,0137	72	51	73566	83061	85263	89990
4	3420	1835	5,0	6,0	0,0097	0,0095	72	73	129596	91375	153431	107019
5	1455	1839	12,0	6,0	0,0182	0,0144	38	48	99129	121598	102851	128783
6	1752	1592	5,0	5,0	0,0072	0,0108	97	64	82724	101973	104709	116243
7	3263	2298	6,0	2,5	0,0164	0,026	42	27	158970	76357	170171	79430
9	2366	2272	5,0	6,0	0,0154	0,0156	45	44	48531	48513	60071	53629
11	1555	1551	3,0	2,5	0,0082	0,0051	85	137	83025	82606	107296	128804
12	1429	1760	2,6	4,0	0,0082	0,0054	85	129	63025	72122	81492	101824
13	2435	1999	5,0	6,0	0,0055	0,0059	125	118	91975	93034	144404	133636
14	1786	2668	5,0	4,0	0,015	0,0103	46	67	99249	125949	109086	146587
15	930	991	1,3	8,0	0,005	0,0088	137	79	50210	53379	77464	67029
16	1247	1621	5,0	5,0	0,0102	0,0074	68	93	47886	54774	55435	71822
17	1263	2303	8,0	5,0	0,0262	0,0272	26	25	48991	46960	53547	50352
19	760	1066	12,1	8,0	0,0142	0,0145	49	48	54645	76159	58830	81286
21	1888	1685	12,0	12,0	0,0139	0,0126	50	55	126465	127075	136712	139413
23	847	1099	6,0	12,0	0,0099	0,009	70	77	51336	63985	60015	80545
25	2063	1478	3,0	5,0	0,0148	0,006	47	116	84012	79952	90389	112909
26	2300	1115	2,5	6,0	0,0146	0,0099	48	70	29384	19130	35616	30010
27	1664	2270	5,0	5,0	0,0123	0,0154	56	45	77888	114922	84757	124329
28	1302	1554	5,0	4,0	0,0153	0,0145	45	48	73826	42602	78085	47604
29	1375	1237	3,0	3,0	0,0156	0,0166	44	42	64224	55787	68223	59217
30	1108	2495	2,0	5,0	0,0132	0,0114	52	61	61933	84362	67479	95180
Promedio	1683	1753	5,5	5,7	0,0123	0,012	66	70	76733	78182	90485	93370
MG	1563	1691	4,7	5,3	0,0114	0,0109	61	64	71649	72538	84708	86999
S	687	470	3,0	2,4	0,0048	0,0057	28	31	29942	28005	33885	32813
CV (%)	41	27	55	42	39	47	42	44	39	36	37	35
M _{min}	760	991	1,3	2,5	0,005	0,0051	26	25	29384	19130	35616	30010
M _{máx}	3420	2668	12,1	12,0	0,0262	0,0272	137	137	158970	127075	170171	146587

La gráfica de concentraciones plasmáticas promedio de EFV vs tiempo se presenta en la Ilustración 4-F. Se puede apreciar una similitud entre los valores promedio de ambas formulaciones.



En la Tabla 4.12 se presentan los resultados de los IC del 90% para los cocientes Estudio/Referencia de los parámetros farmacocinéticos (ln-transformados) $C_{\text{máx}}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$, con un nivel de significancia de 0,05. Los mismos se encontraron dentro de la región de bioequivalencia establecida, con lo cual se rechazó la hipótesis nula H_0 por la Prueba de Schuirmann para dos colas que planteaba que las formulaciones no eran bioequivalentes.

Tabla 4.12: Cocientes E/R obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%.

Parámetro	Relación media %	IC 90%	Probabilidad de exceder los límites de aceptación		
			<80%	>125%	Potencia estadística
In $C_{\text{máx}}$ %	92,5	81,7 – 104,7	0,0287	0,0002	0,91
In ABC_{0-192h} %	98,8	90,2 – 108,2	0,0003	0,0001	0,99
In $ABC_{0-\infty}$ %	97,4	88,8 – 106,7	0,0007	0,0001	0,99

ABC_{0-192} = ABC de 0 hasta las 192 h; $ABC_{0-\infty}$ = ABC de 0 a infinito.

En la Tabla 4.13 se presenta el ANOVA para cada una de las variables farmacocinéticas de EFV considerando las diferentes fuentes de variación. Para cada una de ellas se presentan los grados de libertad, el valor de F (distribución F de Fisher-Snedecor) y su probabilidad asociada (Valor de p).

Tabla 4.13: ANOVA para las fuentes de variabilidad de EFV.

Fuente de Variación	Grados de libertad	$C_{\text{máx}}$		ABC_{0-t}		$ABC_{0-\infty}$	
		F	Valor de p	F	Valor de p	F	Valor de p
Secuencia	1	0,012	0,915	1,377	0,253	0,981	0,333
Error interindividual	22	2,737	0,011	8,163	0,000	7,577	0,000
Formulación	1	1,181	0,289	0,054	0,819	0,249	0,622
Periodo	1	2,853	0,105	7,169	0,014	7,970	0,010

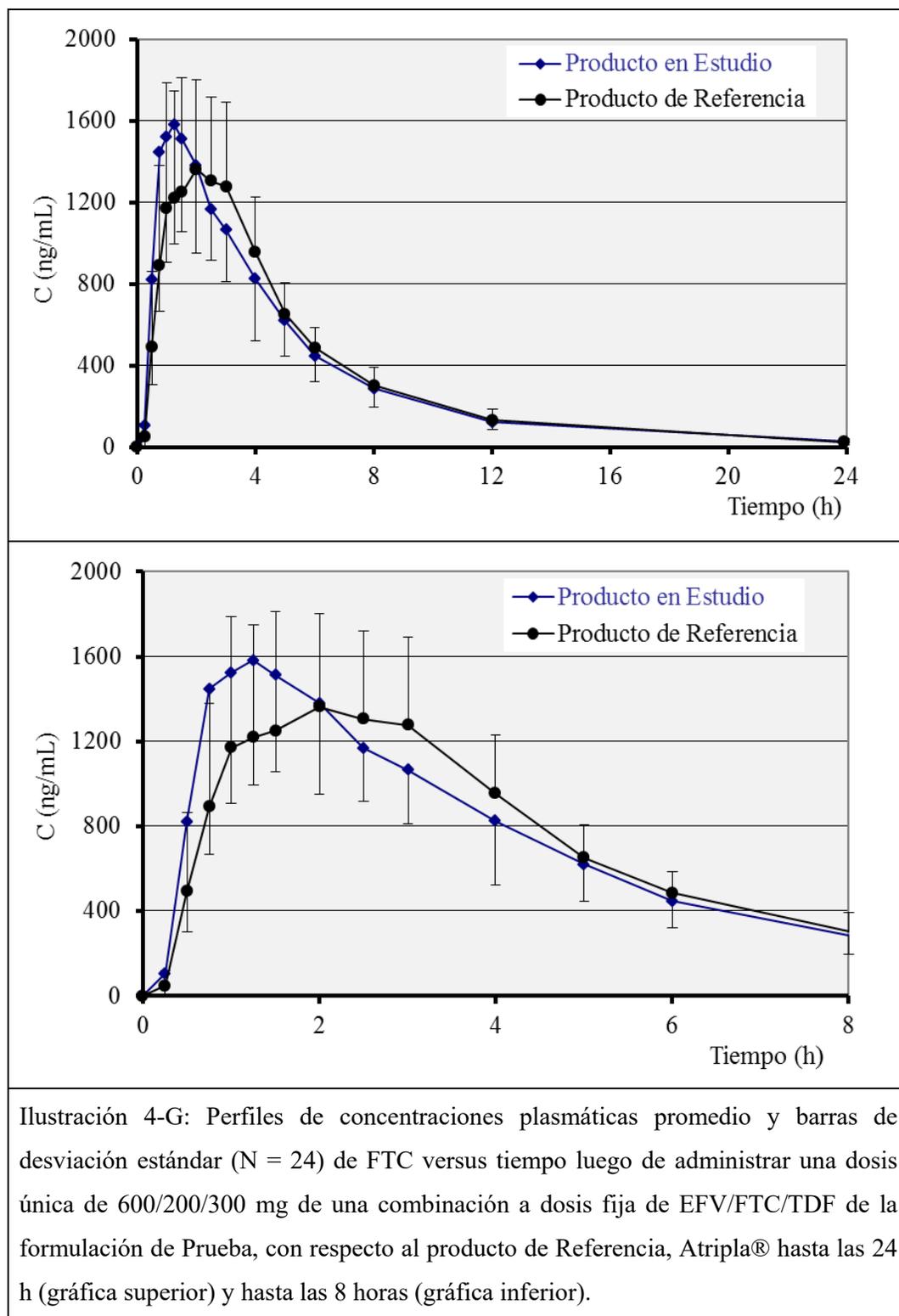
4.5.4.2 Resultados farmacocinéticos para FTC

A partir de las concentraciones plasmáticas de FTC se determinaron los diferentes parámetros farmacocinéticos tal como se puede apreciar en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14: Parámetros farmacocinéticos de FTC para cada voluntario.

Sujeto	$C_{\text{máx}}$ (ng.mL ⁻¹)		$T_{\text{máx}}$ (h)		K_e (h ⁻¹)		$T_{1/2}$ (h)		ABC_{0-24h} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)		$ABC_{0-\infty}$ (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	
	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>
1	1521	1227	1,5	2,5	0,265	0,218	2,6	3,2	6632	5533	7053	6001
2	2088	2033	0,8	1,5	0,203	0,252	3,4	2,8	6948	7637	7467	8107
3	2070	1183	2,0	2,0	0,281	0,229	2,5	3,0	6129	4768	6420	5222
4	2176	1099	1,0	1,0	0,277	0,238	2,5	2,9	7784	5546	8133	5976
5	3077	1867	0,8	2,5	0,186	0,270	3,7	2,6	9457	7625	10250	8055
6	2037	2134	0,8	1,3	0,254	0,289	2,7	2,4	8201	6920	8741	7156
7	2402	2314	0,8	1,0	0,254	0,277	2,7	2,5	10836	8770	11385	9070
9	1715	1865	1,5	2,0	0,191	0,348	3,6	2,0	5033	7791	5383	7978
11	1631	1525	3,0	1,5	0,229	0,252	3,0	2,8	7264	6195	7695	6762
12	2162	1803	1,3	1,0	0,158	0,170	4,4	4,1	8793	7384	9162	8397
13	2692	2052	0,8	2,0	0,229	0,276	3,0	2,5	8824	7131	9265	7466
14	1307	2911	3,0	3,0	0,162	0,115	4,3	6,0	10098	11530	10427	14587
15	3054	1723	1,3	3,0	0,193	0,234	3,6	3,0	7495	7550	8135	8285
16	1067	1158	1,3	3,0	0,180	0,204	3,9	3,4	5247	6175	5977	6885
17	1831	1560	1,0	0,8	0,205	0,230	3,4	3,0	7863	7464	8651	8031
19	1104	1048	1,5	1,5	0,175	0,111	4,0	6,2	4980	5863	5691	6362
21	2765	2381	1,5	2,0	0,197	0,203	3,5	3,4	10275	8640	11157	9313
23	1700	1991	0,8	2,5	0,273	0,185	2,5	3,7	5519	6734	5738	7344
25	1741	2073	1,5	1,0	0,098	0,271	7,1	2,6	7154	7327	7704	7763
26	1134	1111	1,0	2,0	0,219	0,202	3,2	3,4	5681	5724	6089	6304
27	1533	1263	2,0	1,3	0,216	0,209	3,2	3,3	7567	7304	8411	8054
28	1898	1485	1,0	1,3	0,199	0,221	3,5	3,1	7770	8091	8509	8843
29	1745	1522	0,8	3,0	0,241	0,217	2,9	3,2	6746	8240	7239	8930
30	974	2619	1,5	1,0	0,239	0,244	2,9	2,8	4693	8055	5044	8505
Promedio	1893	1748	1,3	1,8	0,214	0,228	3,4	3,2	7375	7250	7905	7892
MG	1803	1677	1,2	1,7	0,209	0,221	3,3	3,1	7178	7128	7708	7729
S	596	513	0,6	0,7	0,044	0,052	1,0	1,0	1739	1392	1803	1790
CV (%)	32	29	48	41	21	23	28	31	24	19	23	23
$M_{\text{mín}}$	974	1048	0,8	0,8	0,098	0,111	2,5	2,0	4693	4768	5044	5222
$M_{\text{máx}}$	3077	2911	3,0	3,0	0,281	0,348	7,1	6,2	10836	11530	11385	14587

La gráfica de concentraciones plasmáticas promedio de FTC vs tiempo presentada en la Ilustración 4-G se observó una diferencia respecto de $C_{m\acute{a}x}$, y un menor valor de $T_{m\acute{a}x}$ del producto de Estudio respecto de la Referencia.



En la Tabla 4.15 se presentan los resultados de los IC del 90% para los cocientes Estudio/Referencia de los parámetros farmacocinéticos (ln-transformados) $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$, con un nivel de significancia de 0,05. A pesar de haber una diferencia observable respecto de $C_{m\acute{a}x}$, todos los parámetros farmacocinéticos evaluados se encontraron dentro de la región de bioequivalencia establecida, con lo cual se rechazó la hipótesis nula H_0 por la Prueba de Schuirmann para dos colas que planteaba que las formulaciones no eran bioequivalentes.

Tabla 4.15: Cocientes E/R obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%.

Parámetro	Relación media %	IC 90%	Probabilidad de exceder los límites de aceptación		
			<80%	>125%	Potencia estadística
In $C_{m\acute{a}x}$ %	107,5	94,8 – 121,9	0,0003	0,0255	0,90
In ABC_{0-24h} %	100,7	93,2 – 108,8	0,0000	0,0000	1,00
In $ABC_{0-\infty}$ %	99,7	92,3 – 107,8	0,0000	0,0000	1,00

$ABC_{0-24} = ABC$ de 0 hasta las 24 h; $ABC_{0-\infty} = ABC$ de 0 a infinito.

En la Tabla 4.16 se presenta el ANOVA para cada una de las variables farmacocinéticas de FTC considerando las diferentes fuentes de variación. Para cada una de ellas se presentan los grados de libertad, el valor de F (distribución F de Fisher-Snedecor) y su probabilidad asociada (Valor de p).

Tabla 4.16: ANOVA para las fuentes de variabilidad de FTC.

Fuente de Variación	Grados de libertad	$C_{m\acute{a}x}$		ABC_{0-t}		$ABC_{0-\infty}$	
		F	Valor de p	F	Valor de p	F	Valor de p
Secuencia	1	0,873	0,360	0,052	0,822	0,002	0,966
Error interindividual	22	1,907	0,069	2,912	0,008	2,998	0,006
Formulación	1	0,982	0,333	0,024	0,879	0,004	0,951
Periodo	1	3,390	0,079	0,681	0,418	0,755	0,394

4.5.4.3 Resultados farmacocinéticos para TFV

A partir de las concentraciones plasmáticas de TFV se determinaron los diferentes parámetros farmacocinéticos tal como se puede apreciar en la Tabla 4.17.

Tabla 4.17: Parámetros farmacocinéticos de TFV para cada voluntario.

Sujeto	$C_{\text{máx}}$ (ng.mL ⁻¹)		$T_{\text{máx}}$ (h)		K_e (h ⁻¹)		$T_{1/2}$ (h)		ABC_{0-48h} (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)		$ABC_{0-\infty}$ (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	
	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>E</i>	<i>R</i>
1	169	252	1,5	2,0	0,0533	0,0511	13	14	1329	1390	1749	1844
2	539	333	0,8	0,8	0,0617	0,0523	11	13	1733	1506	2117	1980
3	365	228	1,5	3,0	0,0795	0,0918	9	8	1270	718	1424	970
4	378	272	0,8	1,0	0,0463	0,0678	15	10	1650	1108	2313	1291
5	505	345	0,5	2,0	0,0454	0,0412	15	17	2489	2654	2793	3038
6	200	315	0,5	1,3	0,0405	0,0397	17	17	1996	1958	2262	2235
7	505	513	0,8	0,8	0,0344	0,0357	20	19	2289	2327	2756	2840
9	357	347	0,8	1,0	0,0569	0,0359	12	19	1200	1585	1512	1905
11	320	317	0,8	1,0	0,064	0,0362	11	19	1407	1482	1712	2332
12	674	682	0,6	0,8	0,0406	0,0414	17	17	2597	2864	3045	3190
13	260	200	0,5	1,5	0,0471	0,0781	15	9	1100	936	1489	1095
14	192	186	1,0	2,0	0,0794	0,0549	9	13	1172	1195	1619	1513
15	250	178	0,5	3,0	0,0468	0,0301	15	23	919	1392	1260	1915
16	248	272	1,0	1,0	0,0617	0,0558	11	12	1108	888	1354	1101
17	230	208	0,8	0,5	0,0466	0,052	15	13	1176	1012	1645	1309
19	216	201	0,8	1,5	0,0295	0,0383	23	18	1460	1365	1843	1647
21	449	282	0,8	0,5	0,0404	0,0341	17	20	2835	2305	3236	2766
23	322	274	0,8	1,3	0,0313	0,0293	22	24	1560	1448	1908	1824
25	286	261	1,3	0,8	0,0333	0,0684	21	10	1658	1370	2021	1630
26	353	234	1,3	2,0	0,0567	0,0638	12	11	1221	1202	1512	1481
27	206	157	1,3	1,5	0,062	0,0561	11	12	1312	985	1656	1270
28	284	226	0,8	1,3	0,0342	0,0349	20	20	1655	1776	1974	2085
29	384	503	0,5	0,8	0,0501	0,0411	14	17	1415	2678	1970	3014
30	192	358	0,8	1,5	0,0546	0,042	13	17	992	2500	1278	2817
Promedio	328	298	0,8	1,4	0,0499	0,0488	15	16	1564	1610	1935	1962
MG	307	279	0,8	1,2	0,0481	0,0466	14	15	1492	1499	1867	1850
S	130	121	0,3	0,7	0,0137	0,016	4	4	523	630	553	681
CV (%)	40	41	37	51	28	33	28	29	33	39	29	35
$M_{\text{mín}}$	169	157	0,5	0,5	0,0295	0,0293	9	8	919	718	1260	970
$M_{\text{máx}}$	674	682	1,5	3,0	0,0795	0,0918	23	24	2835	2864	3236	3190

La gráfica de concentraciones plasmáticas promedio de TFV vs tiempo se presenta en la Ilustración 4-H. AL igual que para FTC, también se observó una diferencia en $C_{\text{máx}}$ y $T_{\text{máx}}$ entre ambas formulaciones.

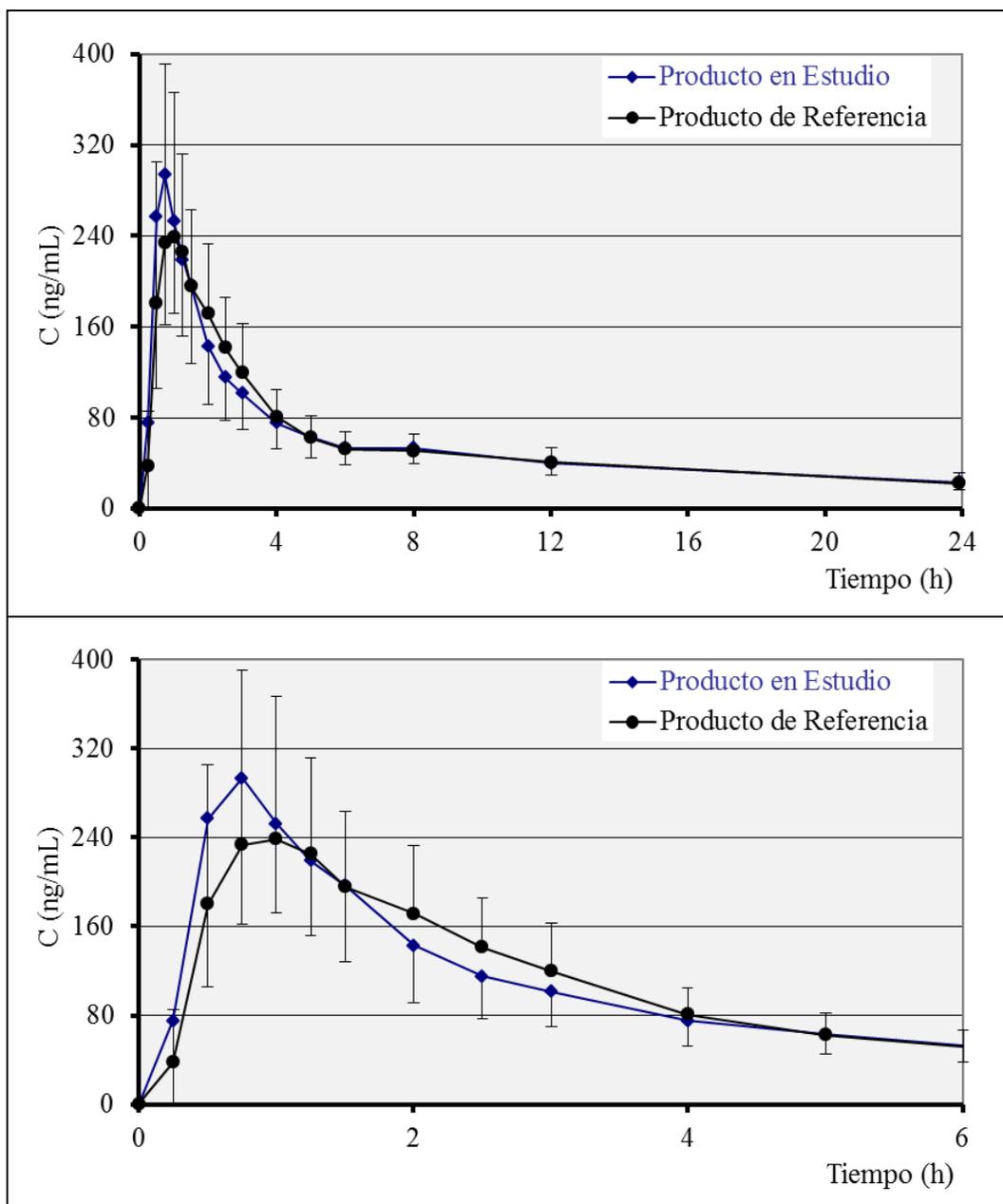


Ilustración 4-H: Perfiles de concentraciones plasmáticas promedio y barras de desviación estándar (N = 24) de TFV versus tiempo luego de administrar una dosis única de 600/200/300 mg de una combinación a dosis fija de EFV/FTC/TDF de la Formulación de Prueba, con respecto al producto de Referencia, Atripla® hasta las 24 h (gráfica superior) y hasta las 6 horas (gráfica inferior).

En la Tabla 4.18 se presentan los resultados de los IC del 90% para los cocientes Estudio/Referencia de los parámetros farmacocinéticos (ln-transformados) $C_{\text{máx}}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$, con un nivel de significancia de 0,05. Los mismos se encuentran dentro de la región de bioequivalencia establecida, con lo cual se rechazó la hipótesis nula H_0 por la Prueba de Schuirmann para dos colas que planteaba que las formulaciones no eran bioequivalentes.

Tabla 4.18: Cocientes E/R obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%.

Parámetro	Relación media %	IC 90%	Probabilidad de exceder los límites de aceptación		
			<80%	>125%	Potencia estadística
In $C_{\text{máx}}$ %	109,9	98,8 – 122,3	0,0000	0,0252	0,96
In ABC_{0-48h} %	99,5	89,0 – 111,3	0,0015	0,0010	0,97
In $ABC_{0-\infty}$ %	101,0	91,0 – 112,0	0,0005	0,0010	0,95

$ABC_{0-48} = ABC$ de 0 hasta las 48 h; $ABC_{0-\infty} = ABC$ de 0 a infinito.

En la Tabla 4.19 se presenta el ANOVA para cada una de las variables farmacocinéticas de TFV considerando las diferentes fuentes de variación. Para cada una de ellas se presentan los grados de libertad, el valor de F (distribución F de Fisher-Snedecor) y su probabilidad asociada (Valor de p).

Tabla 4.19: ANOVA para las fuentes de variabilidad de TFV.

Fuente de Variación	Grados de libertad	$C_{\text{máx}}$		ABC_{0-t}		$ABC_{0-\infty}$	
		F	Valor de p	F	Valor de p	F	Valor de p
Secuencia	1	2,212	0,151	0,390	0,539	0,264	0,613
Error interindividual	22	4,496	0,000	3,868	0,001	3,607	0,002
Formulación	1	2,298	0,144	0,006	0,941	0,024	0,877
Periodo	1	0,258	0,617	0,646	0,430	0,534	0,473

4.6 Conclusiones

Se desarrolló y validó una metodología bioanalítica para cuantificar EFV, FTC y TFV en plasma humano mediante SPE con detección por LC-MS/MS. Las cifras analíticas de mérito estuvieron dentro de los criterios de aceptación de las guías de validación, nacional e internacionales.

El método además de específico, sensible, preciso y exacto resultó adecuado para ser aplicado a muestras provenientes de un estudio de biodisponibilidad comparada de EFV, FTC y TDF 600/200/300 mg respectivamente ya que el límite de cuantificación fue acorde para describir el perfil farmacocinético de estos ARVs. Si bien el tiempo de corrida podría haber sido menor se priorizó asegurar que el sistema pudiera regresar a las condiciones iniciales y así evitar cualquier efecto indeseado. Además, a pesar que el tiempo para procesar gran cantidad de muestras (> 150) estuvo limitado por el material disponible para realizar la SPE, se pudieron procesar aproximadamente 120 muestras diarias.

Todas las muestras tuvieron concentraciones de EFV por encima del LIC lo cual puso en evidencia el correcto rango lineal, así como también el apropiado muestreo con el fin de describir la curva de biodisponibilidad de EFV en plasma humano. FTC y TFV presentaron concentraciones por debajo de sus LIC a tiempos de muestreo mayores a 24 y 48 h respectivamente. Esto era de esperar debido a sus $t_{1/2}$ y a sus propiedades farmacocinéticas ya que el muestreo prolongado estuvo condicionado por la farmacocinética de EFV.

En la Ilustración 4-F, Ilustración 4-G e Ilustración 4-H se evidenció gráficamente una diferencia entre ambas formulaciones en $C_{m\acute{a}x}$ y $T_{m\acute{a}x}$ para FTC y TFV no siendo evidente gráficamente el mismo comportamiento para EFV aunque el promedio para $T_{m\acute{a}x}$ en este caso también es menor para la formulación en estudio. En líneas generales, la concentración plasmática en sangre depende de la velocidad de liberación de las moléculas desde su forma farmacéutica, de la velocidad de disolución y de la velocidad de absorción.

La liberación es la primera etapa de las cinco que pueden producirse durante el tránsito de un medicamento por el organismo (LADME). Esta constituye la “salida” del fármaco de la forma farmacéutica que lo transporta. Por lo general, implica la disolución del fármaco en algún medio corporal. Mediante la aplicación de procesos

farmacotécnicos adecuados se puede conseguir modular la velocidad de liberación. Entre los factores que influyen en la velocidad de liberación pueden citarse: tamaño de partícula (superficie), solubilidad del fármaco (pH del medio, formación de sales, diferentes polimorfos), formulación del medicamento, técnica de elaboración, tipo de forma farmacéutica.

El polimorfismo cristalino es la capacidad que tiene un compuesto para formar estructuras diferentes y se denomina polimorfo a cada forma en que un compuesto es capaz de cristalizar. Como cada polimorfo presenta propiedades fisicoquímicas características (solubilidad, estabilidad, higroscopicidad), se comporta de forma diferente durante el proceso LADME. En ocasiones, estas diferencias producen alteraciones importantes en la eficacia del tratamiento. Desde un punto de vista biofarmacéutico y para activos poco solubles, la velocidad de disolución de cada polimorfo será el factor limitante de la absorción y su solubilidad dependerá de la forma cristalina. Se conocen más de un polimorfo tanto para EFV (Fandaruff y col., 2014) como para TDF (Sládková y col., 2016).

Los resultados del ANOVA para $C_{\text{máx}}$ y ABC demostraron que no existen diferencias significativas para TFV y TFC respecto de la Formulación, Secuencia y Período. En el análisis de EFV se observa, sin embargo, un efecto Período significativo con $p = 0,014$ para ABC_{0-T} y $p = 0,010$ para $ABC_{0-\infty}$. En el análisis de las posibles causas de este efecto y considerando la larga vida media del EFV, se debe evaluar la posibilidad de un efecto arrastre (carry over) por tiempo insuficiente lavado. En este caso fue posible descartar un posible arrastre de EFV en el estudio ya que el 100% de las muestras pre-dosis correspondientes del segundo período presentan valores de concentración por debajo del límite de cuantificación de la metodología bioanalítica ($LIC=51,8 \text{ ng.mL}^{-1}$), y el 80% de estas ni siquiera presenta niveles detectables del analito en plasma, demostrando la efectividad del período de lavado utilizado. El efecto período observado posiblemente pueda deberse a una causa externa no relacionada con las formulaciones ni con el diseño del estudio. Cabe destacar que el estudio fue conducido bajo procedimientos estandarizados y no se observó ningún desvío. Por lo tanto, a pesar que el ANOVA revela para el ABC de EFV un efecto período significativo, el mismo no influye en la comparación entre las formulaciones y en la evaluación de la bioequivalencia.

Ambas formulaciones (estudio/referencia) resultan entonces terapéuticamente equivalentes ya que la velocidad y cantidad de los fármacos activos que se absorben es semejante, lo que permite inferir que los mismos llega al tejido o área donde produce su efecto de forma similar.

**5. DESARROLLO, VALIDACIÓN Y
COMPARACIÓN DE 2 METODOLOGÍAS
BIOANALÍTICAS POR LC-MS/MS (MS²) y
LC/MS/MS/MS (MS³) PARA CUANTIFICAR
LAMIVUDINA, NEVIRAPINA Y
ZIDOVUDINA EN PLASMA HUMANO**

5.1 Resumen

Se desarrollaron y validaron 2 metodologías bioanalíticas para cuantificar Lamivudina (3TC), Nevirapina (NVP) y Zidovudina (AZT) por LC-MS² y LC-MS³ en plasma humano utilizando FTC como EI. Los analitos fueron extraídos a partir de 300 µL de plasma humano por precipitación de proteínas con ACN. En el desarrollo metodológico se implementaron metodologías de LC-MS/MS (MS²) y LC-MS/MS/MS (MS³). Ambas metodologías fueron lineales en el rango 24 - 4.030 ng.mL⁻¹ para 3TC, 25 - 4.130 ng.mL⁻¹ para NVP y 25 - 4.090 ng.mL⁻¹ para AZT. Debido a que la técnica de MS³ presenta un paso más de fragmentación, esta permite una mayor especificidad que la técnica convencional de MS². Las cifras analíticas de mérito de ambas metodologías estuvieron dentro de los criterios de aceptación de las guías de validación, nacional e internacionales (ANMAT, 2005; Anvisa, 2003; USFDA, 2001).

5.2 Introducción

El incremento en la sensibilidad y especificidad de los métodos de cuantificación de fármacos y metabolitos en fluidos biológicos es uno de los objetivos analíticos más desafiantes que enfrenta hoy la espectrometría de masas. Las matrices biológicas son altamente complejas y los niveles de detección requeridos en estudios de farmacología clínica son extremadamente bajos. Debido a esto, la técnica analítica de referencia es LC-MS/MS, ya que es capaz de proveer mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas tradicionales de HPLC acoplado a detectores de absorción UV o fluorescencia. En el análisis cuantitativo por espectrometría de masas, el incremento en el número de fragmentaciones secuenciales a las que se somete un analito permite, en teoría, obtener una mejora en el desempeño analítico en cuanto a cifras analíticas de mérito se refiere, principalmente en especificidad y sensibilidad analítica (Ekman, Silberring, y Westman-Brinkmalm, 2009).

La trampa de iones 2D, también conocida como trampa de iones lineales (LIT), es un analizador basado en cuadrupolos que terminan en lentes que repelen los iones dentro de las varillas utilizando potenciales positivos para iones positivos y viceversa. En estas trampas, los iones están confinados en la dimensión radial por medio de un campo cuadrupolar y en la dimensión axial por medio de un campo eléctrico en los extremos de la trampa. La trampa lineal con eyección axial fue desarrollada por Hager, de MDS Sciex, en 2002, en la cual los iones se expulsan axialmente usando efectos de campo de franja aplicando voltajes alternos entre las varillas de la trampa lineal y la lente de salida. Una gran ventaja de las LIT es la capacidad de captura de iones la cual se combina con la capacidad de contener muchos iones antes de que se produzcan efectos de carga espacial debido a un mayor volumen de la trampa y a un enfoque a lo largo de la línea central en lugar de alrededor de un punto. Incluso con 20.000 iones atrapados, se pueden obtener espectros de masa bien resueltos sin ningún efecto de carga espacial en trampas de iones 2D, mientras que más de 500 iones atrapados en trampas 3D inducen efectos de carga espacial. Otra ventaja común es la mayor eficacia de captura. De hecho, se logra una eficacia de captura de más del 50% cuando se inyectan iones en el colector de iones 2D de una fuente externa, mientras que esta eficiencia de captura es sólo del 5% para la trampa de iones 3D. Ambas ventajas aumentan la sensibilidad y el rango dinámico (Hoffmann y Stroobant, 2007).

Tal como se detalló en la Tabla 1.10 los instrumentos QqQ pueden realizar análisis de MS² pero la combinación de Q con tecnología LIT en forma de un

instrumento de configuración QqLIT, utilizando la eyección axial, es particularmente interesante, ya que este instrumento conserva las funciones clásicas de escaneo del triple cuadrupolos al mismo tiempo que proporciona acceso a experimentos de captura de iones es decir que el mismo analizador de masa Q3 se puede ejecutar en dos modos diferentes. Esto permite combinaciones de escaneo muy potentes cuando se realiza la adquisición de datos dependiente de la información.

La Ilustración 5-A muestra el camino de iones en el equipo SCIEX QTRAP[®] 5500. La principal diferencia en la trayectoria de iones es que el skimmer, un cono de metal detrás del orificio, que se utiliza en el API 3200[™] fue sustituido por la guía de iones QJet[™] en el QTRAP[®] 5500. En comparación con el skimmer, el QJet[™] no es sólo un componente de instrumento estático sino también un pequeño cuadrupolo que permite la separación eficiente de iones de moléculas neutras. El orificio del QTRAP[®] 5500 es mayor respecto del API 3200[™], dando como resultado una mayor sensibilidad y una mejor relación señal-ruido. El alto vacío requerido se asegura mediante el uso de bombas turbomoleculares más potentes.

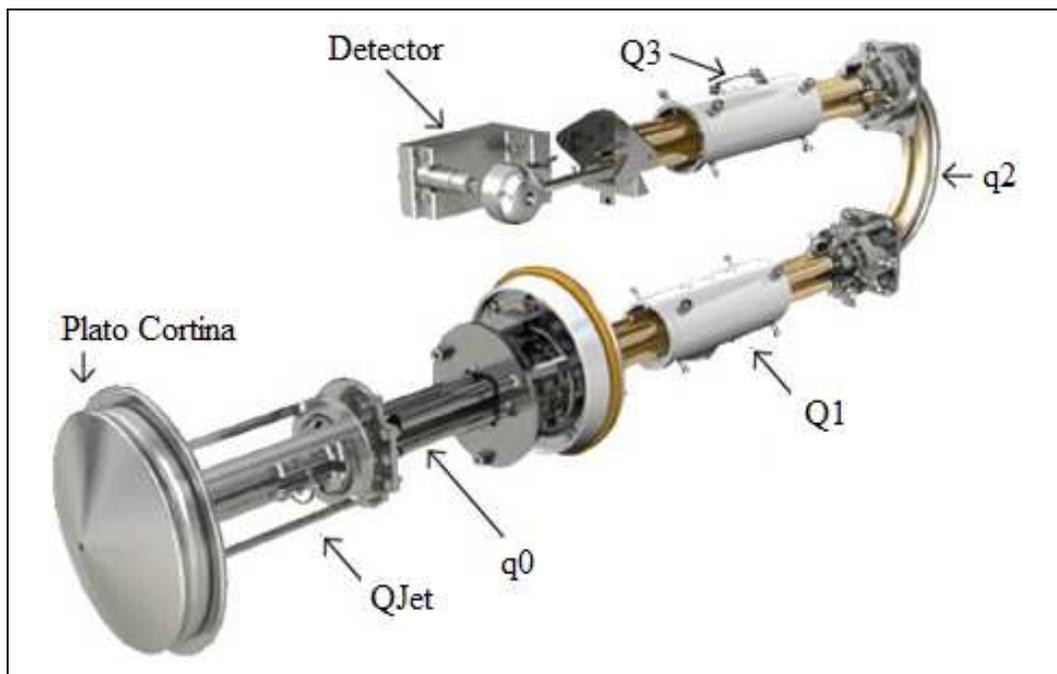


Ilustración 5-A: Camino de iones en el MS 5500 QTRAP[®] (SCIEX).

Debido a la diversidad de formulaciones de ARVs combinados de Lamivudina (3TC), Zidovudina (AZT) y Nevirapina (NVP), disponer de metodologías bioanalíticas capaces de cuantificar múltiples analitos en un solo bioanálisis es de suma importancia. Con este tipo de metodologías es posible determinar con elevada especificidad si una

formulación a dosis fija de 3TC, AZT y NVP produce similares perfiles farmacocinéticos (velocidad y cantidad de absorción de principio activo) que la coadministración de productos innovadores o referentes por separado.

5.2.1 Aspectos Farmacológicos y Farmacocinéticos

3TC es rápidamente absorbida luego de dosis orales y alcanza concentraciones máximas en plasma en aproximadamente una hora. La biodisponibilidad oral es de 80-87% y no se modifica con alimentos no se ve reducida, solo retrasada. 3TC no se fija a proteínas plasmáticas y atraviesa libremente la placenta hasta la circulación fetal y se distribuye en la leche materna. Es metabolizada intracelularmente a su metabolito activo, 3TC-Trifosfato, con capacidad de inhibir competitivamente la transcriptasa inversa (TI) viral y actuar como finalizador de cadena del ADN proviral, el cual posee una vida media prolongada en la célula (12 a 18 horas). La vida media de eliminación de 3TC es de 5 a 7 horas. Presenta un escaso grado de metabolismo hepático (5-10 %) y se elimina por excreción renal de forma inalterada. La probabilidad de que ocurran interacciones metabólicas con otros medicamentos es baja, debido al pequeño metabolismo hepático y a la baja unión a proteínas plasmáticas. 3TC es activa frente al VIH-1 y al VIH-2, pero además posee un potente efecto inhibidor sobre el virus de la hepatitis B (VHB). Tiene un claro sinergismo con AZT, Estavudina, inhibidores no nucleósidos de la TI e inhibidores de las proteasas, por lo que se considera un fármaco muy útil en la terapia combinada del VIH. Se administra por vía oral a dosis de 150 mg cada 12 horas en adultos. En niños deben administrarse 4 (mg.kg⁻¹) cada 12 h en solución oral. Es útil en el tratamiento de la hepatitis crónica por VHB, en la que se ha recomendado 100-300 mg por día, al menos durante 12 semanas (Flexner C., 2006; Martindale y Kathleen, 2009; Mediavilla y Flórez, 1997).

AZT es rápidamente absorbida a través del tracto gastrointestinal y es sometida a metabolismo de primer paso hepático con una biodisponibilidad del 60-70%. El pico de concentración máxima ocurre después de 1 hora. Su absorción es retrasada con la ingesta de alimentos, pero su biodisponibilidad probablemente no se ve afectada, atraviesa la barrera hematoencefálica, la placenta y se distribuye en la leche materna. También se ha detectado en semen. Circula unida a proteínas (34-38%). AZT es metabolizada intracelularmente a AZT-trifosfato que actúa como inhibidor competitivo de la TI y como finalizador de cadena si se incorpora al ADN proviral. También es metabolizada en el hígado a su metabolito inactivo glucurónido y es excretada en la

orina como droga inalterada y metabolito. Su vida media de eliminación es de 1 hora. AZT es activa frente al VIH-1, VIH-2, HTLV-I, lentivirus animales y retrovirus humanos. Se administra por vía oral en dosis de 500-600 mg por día divididas en 2-3 tomas. Se ha empleado con éxito en la prevención de la transmisión vertical del VIH a partir del tercer trimestre (buena tolerancia y ausencia de malformaciones) y en la profilaxis post-exposición accidental (Martindale y Kathleen, 2009; Mediavilla y Flórez, 1997).

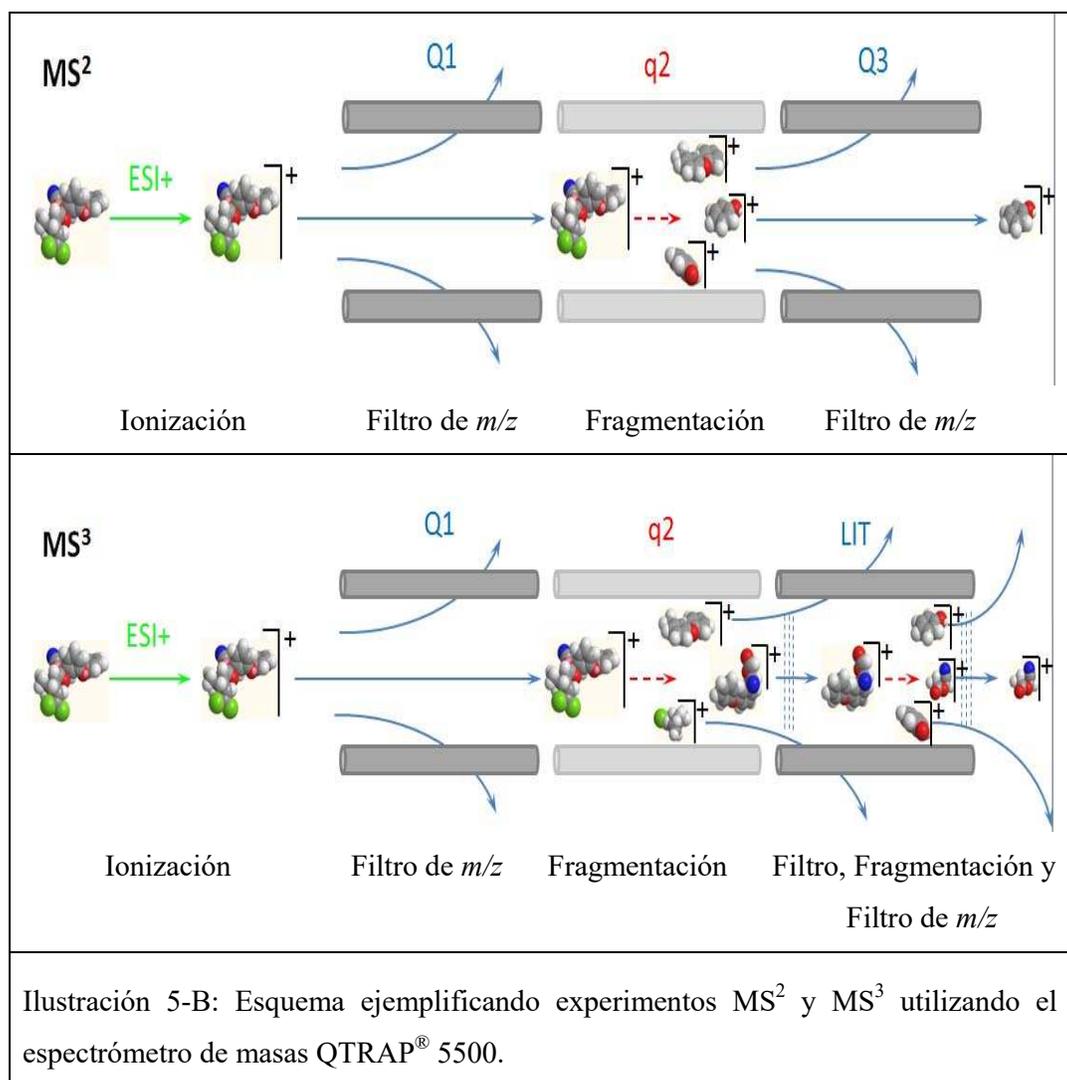
NVP es rápidamente absorbida luego de una dosis oral y esta no se ve afectada por la comida ni los antiácidos. Su biodisponibilidad es mayor al 90%. El pico de concentración plasmática se alcanza a las 4 horas de su administración, circula 60% unida a proteínas y atraviesa barrera hematoencefálica, placenta y se distribuye en leche. Es extensamente metabolizada por enzimas microsomales hepáticas, principalmente CYP3A4 y CYP2B6, a metabolitos hidroxilados y es excretada a través de la orina como conjugados glucurónidos de los metabolitos. El mecanismo de acción de NVP es diferente al de los análogos nucleósidos inhibidores de la TI. Se une directamente a la TI, específicamente con las tirosinas próximas al punto catalítico, inactivando este punto de la enzima, con lo que evita la síntesis del ADN proviral. NVP tiene acción específica frente al virus VIH-1, con un alto índice terapéutico, no es activa frente al VIH-2, otros retrovirus, ni frente a las ADN-polimerasas de las células eucariotas. La dosis en adultos es de 200 mg por día los primeros 14 días, la cual puede ser aumentada a 200 mg dos veces por día de no haber reacciones adversas. También se utiliza como tratamiento de profilaxis en la transmisión vertical (madre-hijo) (Flexner, 2006; Martindale y Kathleen, 2009; Mediavilla y Flórez, 1997).

5.3 Objetivo

- ✓ Desarrollar y validar una metodología bioanalítica para determinar 3TC, NVP y AZT en plasma humano por LC-MS/MS para ser aplicada a estudios de biodisponibilidad comparada.
- ✓ Desarrollar y validar una metodología bioanalítica para determinar 3TC, NVP y AZT en plasma humano por LC-MS/MS/MS.
- ✓ Evaluar críticamente el efecto en el desempeño bioanalítico de un incremento en el número de fragmentaciones, comparando una técnica de LC-MS/MS con otra de LC-MS/MS/MS para la determinación de antiretrovirales (ARVs) en plasma humano.

5.4 Experimental

Las determinaciones fueron realizadas en un instrumento híbrido tipo triple cuadrupolo (QqLIT) de estructura similar a un triple cuadrupolo tradicional (QqQ) pero en el cual el tercer cuadrupolo puede funcionar, adicionalmente, como una trampa lineal de iones. Esto brinda al sistema la posibilidad de realizar experimentos de doble o triple fragmentación (MS^2 y MS^3 respectivamente) al ser operado en modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM) alternativamente como un MS/MS o como un $MS/MS/MS$ tal como se presenta en la Ilustración 5-B.



Para el desarrollo y validación de la metodología bioanalítica se utilizó el equipamiento que consta en la Tabla 5.1, los estándares y reactivos presentados en la Tabla 5.2 y Tabla 5.3 respectivamente.

Tabla 5.1: Equipamiento y materiales generales.

Componente	Marca	Modelo
Cromatógrafo líquido HPLC	Shimadzu	LC 20AD xr
Desgasificador	Shimadzu	DGU-20A3
Inyector automático	Shimadzu	SIL-20A xr
Espectrómetro de masas	Sciex	5500 QTRAP®
Software	Analyst	Versión 1.6.2
Vortex	Boeco	V1 Plus
Centrífuga	Eppendorf	5702R
Micropipetas automáticas	Brand	P100; P200; P1000 y P5000

Tabla 5.2: Estándares analíticos.

Estándar	Propósito	Calidad	Pureza	Lote
3TC	Analito a cuantificar	Primario-USP®	99,3%	I0M388
NVP	Analito a cuantificar	Primario-USP®	99,8%	G0M270
AZT	Analito a cuantificar	Primario-USP®	99,0%	H0F263
FTC	EI	Primario-USP®	99,8%	F0J163

Tabla 5.3: Reactivos.

Componente	Marca	Lote
ACN - grado HPLC	Carlo Erba	D5C058235C
H ₂ O - grado HPLC	Merck	Z0340233
MeOH - grado HPLC	PHARMCO AAPER	C15613006
Formiato de Amonio	Aldrich	MKBL3276V
Ácido Fórmico	Carlo Erba	Q5A012205C

Para los ensayos de especificidad, linealidad, controles de calidad, recuperación y preparación de controles de calidad se utilizaron muestras blanco de plasma humano de 30 individuos tal como se indica en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Material biológico.

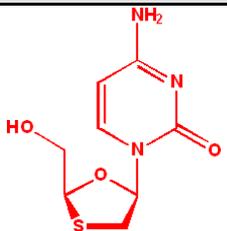
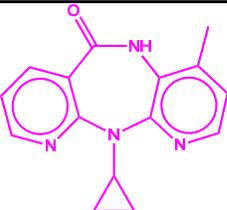
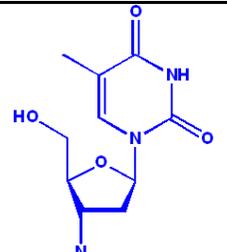
Componente	Fuente	Lote
Plasma Humano Normal	Dominguezlab	PL-Normal-EFV-P1-16
Plasma Humano Lipémico	Dominguezlab	PL-Lipémico-EFV-P1-7
Plasma Humano Hemolizado	Dominguezlab	PL-Hemolizado-EFV-P1-7

5.5 Resultados y Discusión

5.5.1 Desarrollo de las metodologías bioanalíticas

Se introdujeron con bomba de infusión soluciones estándares de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada analito y EI en la fuente ESI a un flujo de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando una bomba de jeringa incorporada en el equipo. Las características químicas de los compuestos analizados se detallan en la Tabla 5.5 (“DrugBank,” 2016).

Tabla 5.5: Información fisico-química de 3TC, NVP, AZT y FTC.

Analito	Estructura Química	CAS	Fórmula Molecular	Masa molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Solubilidad en H_2O ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
3TC		134678-17-4	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	229,3	2,76
NVP		129618-40-2	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$	266,3	0,11
AZT		30516-87-1	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	267,2	16,3
FTC		143491-57-0	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$	247,2	2,0

La secuencia de trabajo comenzó con la búsqueda en Q1 el ión precursor de cada ARV trabajando en modo “escaneo completo” en el rango de 50 a 500 m/z . Una vez

seleccionado el pico base de la molécula se procedió a fragmentarla en q2 para obtener los iones productos en Q3 y de esta manera disponer de los espectros MS². Para obtener las transiciones de MS³ se tomaron de partida las transiciones de MS² y en Q3 se trabajó en modo trampa lineal (LIT) pudiendo de esta manera fragmentar los iones productos y generar los espectros de MS³. Se optimizaron los diferentes potenciales del instrumento para obtener la mayor señal de los iones producto proveniente de los diferentes picos base. Los parámetros optimizados para MS² fueron utilizados para optimizar MS³. En la Tabla 5.6 se presentan las condiciones del espectrómetro para trabajar en modo MRM⁺ y llevar a cabo el análisis cuantitativo de los analitos en estudio en los diferentes experimentos.

Tabla 5.6: Parámetros del QTRAP[®] 5500 utilizados para cuantificar 3TC, NVP y AZT utilizando FTC como EI.

	3TC	NVP	AZT	FTC (EI)
DP (V)	90	160	80	80
EP (V)	10	10	9	9
CEP (V)	21	22	24	16
CE (V)	19	30	22	23
CXP (V)	15	30	15	15
MS ²	230,3>112,0	267,1>226,0	268,0>127,0	248,0>130,0
AF2 (V)	0,12	0,13	0,15	0,15
MS ³	112,0>68,9	226,0>198,4	127,0>110,0	130,0>112,7
Fuente de Iones	ESI ⁺			
Nebulización de iones (V)	5500			
Gas cortina (psi)	20			
Gas de colisión	Alto			
GS1 (psi)	35			
GS2 (psi/°C)	20/500			

EP: Potencial de entrada; DP: Potencial de desglose; CEP: Potencial de entrada a la celda de colisión; CE: Energía de colisión; CXP: Potencial de salida de la celda de colisión. AF2: Energía de excitación.

En todos los casos la mejor señal se obtuvo trabajando en modo positivo [M + H]⁺. En la Ilustración 5-C se presentan los espectros de masas obtenidos y las asignaciones de los fragmentos más importantes tanto para MS² como para MS³.

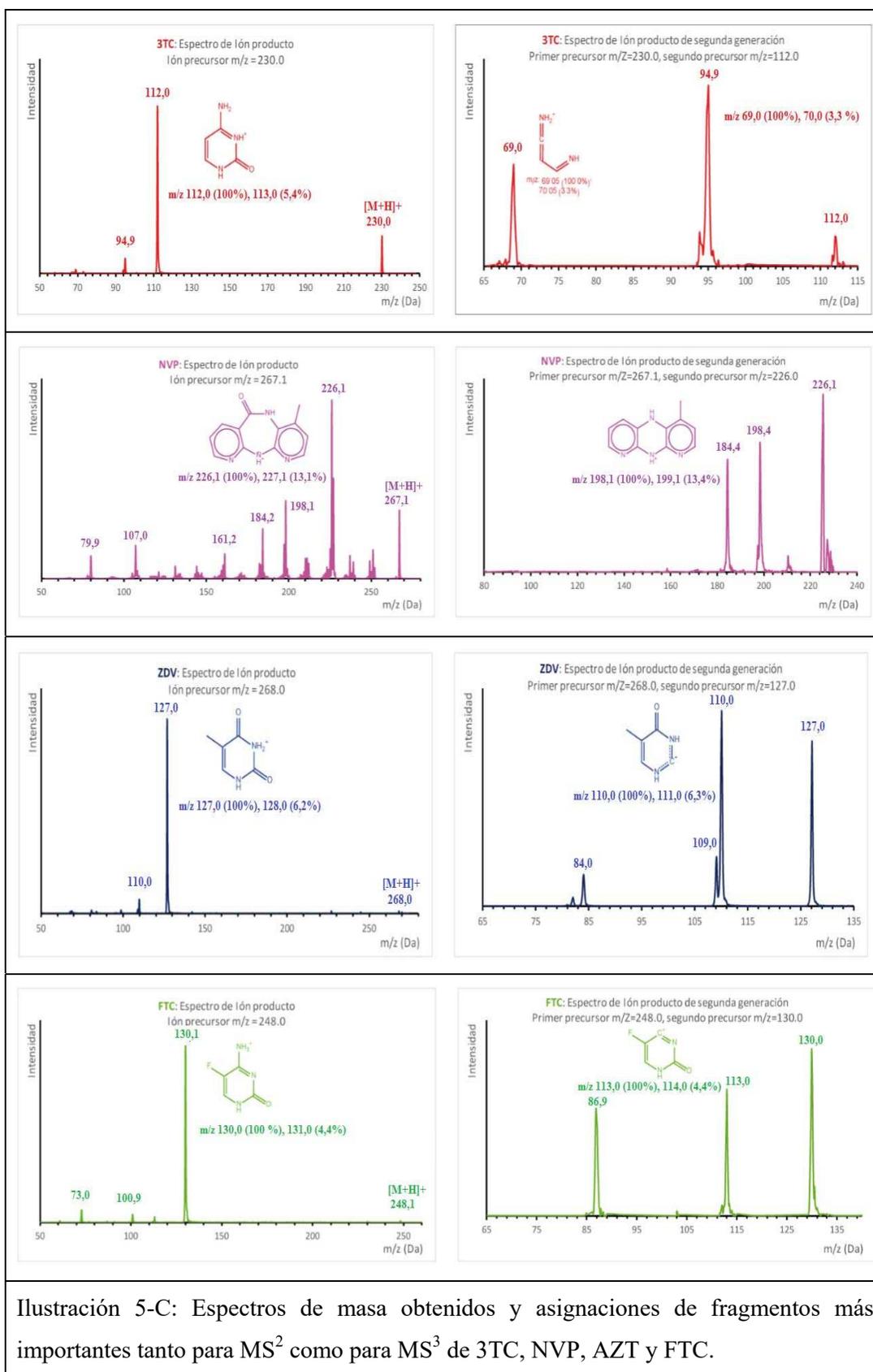


Ilustración 5-C: Espectros de masa obtenidos y asignaciones de fragmentos más importantes tanto para MS² como para MS³ de 3TC, NVP, AZT y FTC.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en modo gradiente, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7: Condiciones cromatográficas para cuantificar EFV, FTC y TFV en plasma humano por LC-MS/MS utilizando TFV-d₇ como EI.

Parámetro	Descripción		
Fase Móvil	A: MeOH:ACN:Formiato de amonio 10 mM (33:22:45). B: ACN + 0,1% Ácido Fórmico.		
Gradiente	Tiempo	Bomba A (mL/min)	Bomba B (mL/min)
	0	0,21	0,075
	0,50	0,21	0,075
	0,55	0,42	0,075
	2,00	0,42	0,075
2,20	0,21	0,075	
Columna analítica	Thermo, Hypersil GOLD C18, 100 × 2,1 mm, 3,0 μm		
Temperatura columna (°C)	40		
Volumen inyección (μL)	25		
Tiempo de corrida (min)	4,0		
Tiempos de retención (min)	3TC: 1,12 NVP: 1,56 AZT: 1,23 FTC: 1,12		

5.5.1 Preparación de controles de calidad (CC)

Para evaluar la veracidad, precisión y estabilidad de los ARVs la matriz de la muestra, se prepararon CC fortificando volúmenes adecuados de plasma blanco con volúmenes de ST de cada uno de los ARVs en cinco niveles de concentración: LIC, bajo, medio, alto y dilución. Se homogeneizaron, se trasvasaron 300 μL a crioviales y se almacenaron a -20 °C. La concentración de cada uno de ellos se indica en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8: Controles de Calidad de EFV, FTC y TFV.

Nivel	C _{3TC} (ng.mL ⁻¹)	C _{NVP} (ng.mL ⁻¹)	C _{AZT} (ng.mL ⁻¹)
CC LIC	26,7	25,2	25,4
CC Bajo	66,7	63,1	63,5
CC Medio	2317,0	2190,4	2206,0
CC Alto	3707,2	3504,6	3529,6
CC Dilución	6673,0	6308,3	6353,3

5.5.2 Metodología de preparación de la recta de calibración

- ✓ En un tubo de 2 mL se colocaron 300 μL de plasma.
- ✓ Se agregó ST1 Mix y ST2 Mix correspondiente a cada nivel, según Tabla 5.9.
- ✓ Se agregaron 100 μL ST1 de EI.
- ✓ Se agregó ACN correspondiente a cada nivel, según Tabla 5.9.
- ✓ Se vortereó 10 segundos y centrifugó a 3000 g por 5 minutos.
- ✓ Se colocaron en un vial HPLC 200 μL de sobrenadante y 600 μL de H_2O y se llevó al cromatógrafo.

Tabla 5.9: Recta de calibración de 3TC, NVP y AZT en plasma humano.

Archivo	V Plasma (μL)	V _{ST1 Mix} (μL)	V _{ST2 Mix} (μL)	V _{ST1-EI} (μL)	V _{ACN} (μL)	C _{3TC, NVP y AZT} en Plasma ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C _{EI Plasma} ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
BPL	300	0	0	0	600	0	0
Nivel 0	300	0	0	100	500	0	7658
Nivel 1	300		25	100	475	24	7658
Nivel 2	300		200	100	300	192	7658
Nivel 3	300		400	100	100	384	7658
Nivel 4	300	100		100	400	800	7658
Nivel 5	300	180		100	320	1440	7658
Nivel 6	300	260		100	240	2080	7658
Nivel 7	300	340		100	160	2720	7658
Nivel 8	300	420		100	80	3360	7658
Nivel 9	300	500		100	0	4000	7658

Observaciones: ST1mix 3TC-AZT-NVP: 2,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ST2 mix 3TC-AZT-NVP: 0,288 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ST1-EI: 22,97 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todas las soluciones de trabajo se prepararon en ACN de manera que todos los niveles tengan la misma proporción de ACN.

5.5.3 Resultados de la validación del método analítico

Los parámetros evaluados en la validación de la metodología bioanalítica fueron: efecto arrastre, selectividad; linealidad, exactitud y precisión intra e inter-día, efecto matriz normalizado, estabilidad del analito en muestras fortificadas. A continuación, se detallan los resultados de cada uno de los parámetros evaluados.

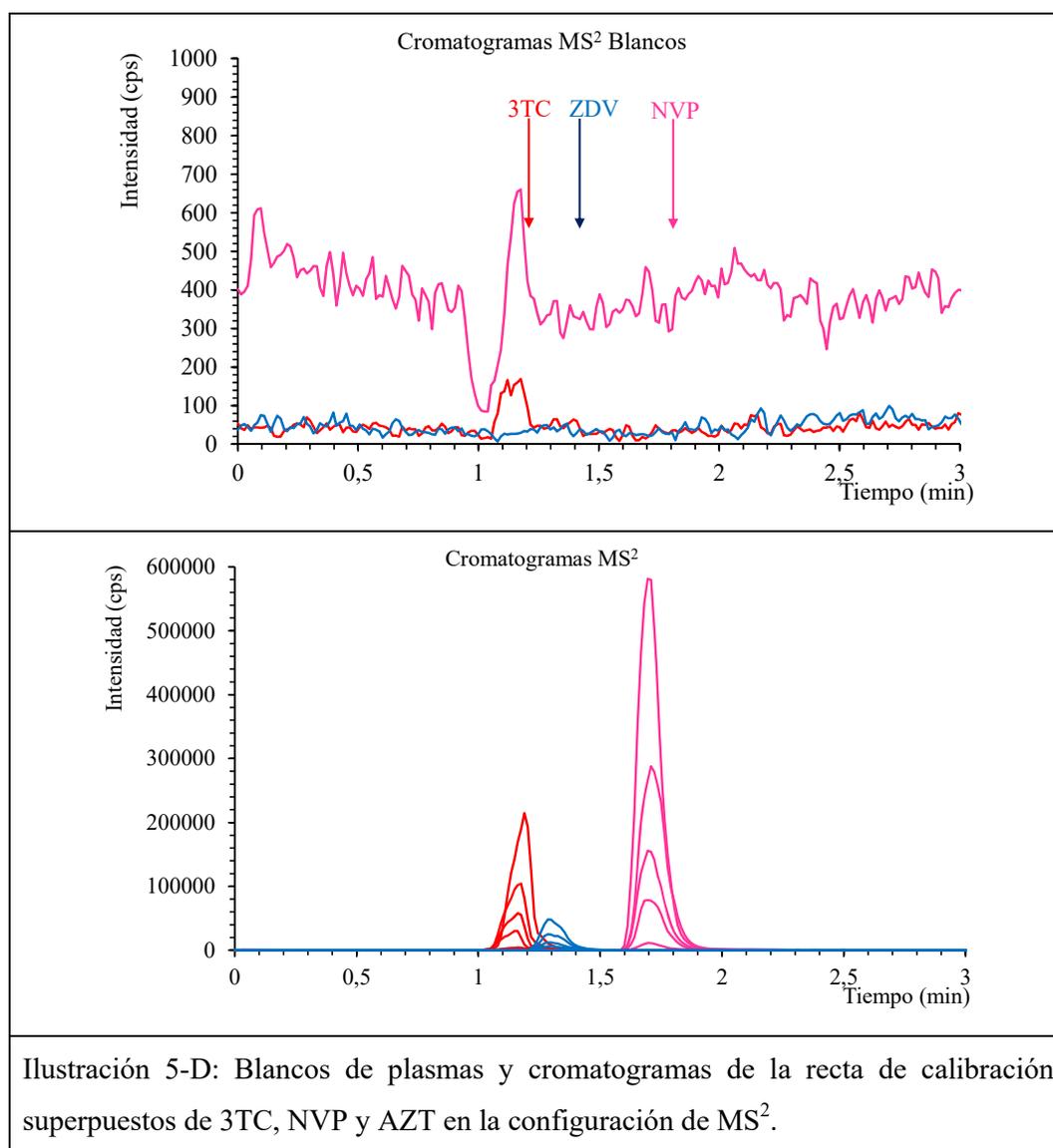
5.5.3.1 Efecto arrastre

Cuando se compararon las áreas de los cromatogramas resultantes en los tiempos de retención de ER (t_{ER}) y de EI (t_{EI}) obtenidos en las inyecciones del BPL, luego de inyectar el mayor nivel de la curva de calibrado (Nivel 9), con aquellas provenientes de

la inyección de un estándar en el LIC, no se observaron interferencias en los tiempos de retención de los analitos, así como tampoco en el de FTC. Por lo que se concluye que no hay contaminación o efecto arrastre de inyecciones previas.

5.5.3.2 Especificidad y linealidad

Para cada analito en estudio se analizó la especificidad en relación a componentes normales de la matriz biológica, a los otros analitos y al EI. Cada muestra blanco, descrita en la Tabla 5.4, se ensayó para determinar la interferencia usando el procedimiento de extracción propuesto y las condiciones cromatográficas. No se encontraron interferencias significativas en el tiempo de retención del fármaco, o EI, como se muestra en los cromatogramas presentados en la Ilustración 5-D e Ilustración 5-E para MS^2 y MS^3 respectivamente.



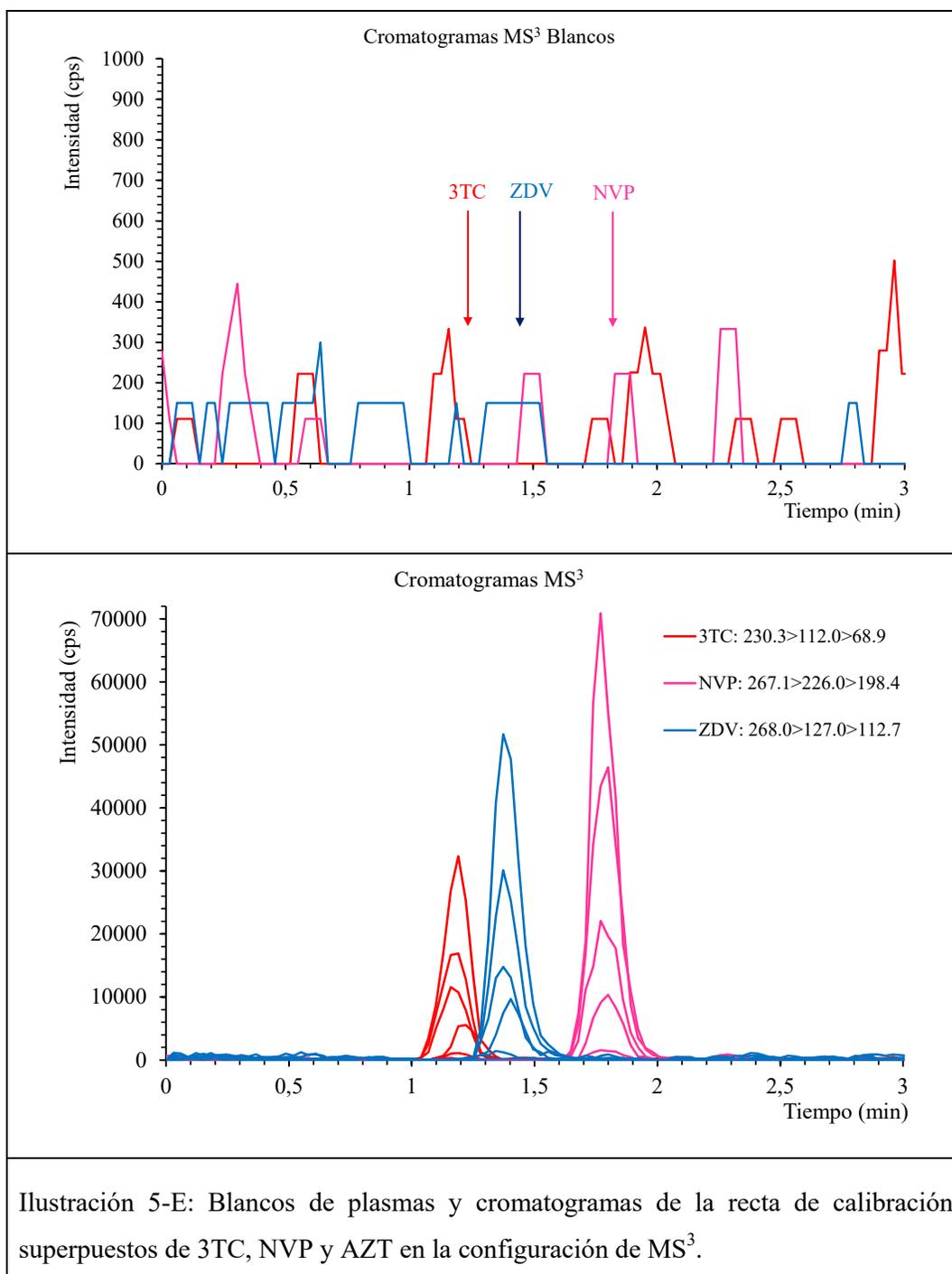
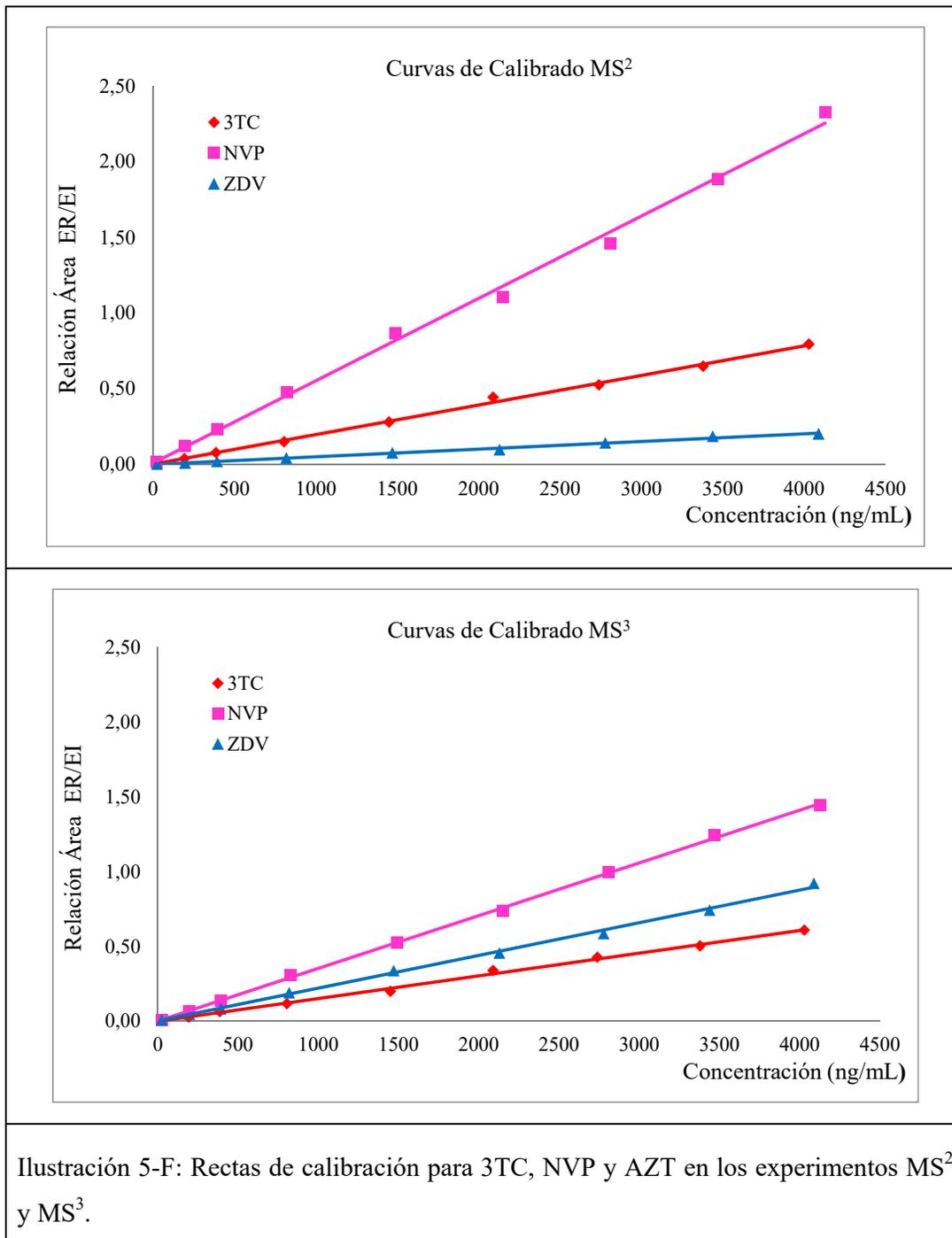


Ilustración 5-E: Blancos de plasmas y cromatogramas de la recta de calibración superpuestos de 3TC, NVP y AZT en la configuración de MS³.

Las rectas de calibración se prepararon sobre blanco de plasma fortificado con soluciones de trabajo de 3TC, NVP, AZT y FTC cubriendo el rango esperado de concentraciones a cuantificar tal como se indica en la Tabla 5.9.

La relación de áreas (analitos/EI) de 3TC, NVP y AZT respecto de FTC en los estándares de calibración fue proporcional a la concentración en plasma humano tanto

para MS² como para MS³ en el rango 24 – 4030, 25 – 4130 y 25 – 4090 ng.mL⁻¹ para 3TC, NVP y AZT respectivamente.



Si bien la concentración del estándar interno estuvo por encima de la concentración máxima de los analitos, no fue el caso de la señal. En la Ilustración 5-F se puede ver en las curvas de calibrado que para el caso de NVP el eje de abscisas (ER/EI) supera el valor de 1 indicando de esta manera que la señal de NVP es superior a la del EI.

Esto puede deberse a los parámetros obtenidos en el espectrómetro de masas respecto del EI en el paso de optimización o a una buena ionización de NVP ya que cromatográficamente es el que tiene un tiempo de retención mayor respecto del EI (1,2 y 1,7 min para EI y NVP respectivamente) separándose de la supresión iónica. La ecuación de la recta de calibración y ajuste lineal se obtuvo mediante regresión lineal por mínimos cuadrados con coeficientes de correlación mayores a 0,99.

5.5.3.3 Precisión y Exactitud Intra e Inter día

En la Tabla 5.10 se presentan los resultados de veracidad y precisión intra e interdía para la cuantificación de 3TC, NVP y AZT en plasma humano por LC-MS/MS y LC-MS/MS/MS respectivamente. La veracidad, precisión se evaluó a través de los CC. Ambas técnicas presentaron valores de ER% y CV% < 15%, a pesar de que la técnica de MS³ tuvo un paso de fragmentación más, esto no produjo un aumento en la variabilidad fuera de los criterios de aceptación de las diferentes guías de validación de metodologías bioanalíticas (ANMAT, 2006; Anvisa, 2003; USFDA, 2001).

Tabla 5.10: Veracidad y precisión intra e inter día para determinar 3TC, NVP y AZT en plasma humano por MS² y MS³.

Analito	CC	Intra día				Inter día			
		MS ²		MS ³		MS ²		MS ³	
		ER%	CV%	ER%	CV%	ER%	CV%	ER%	CV%
3TC	Bajo	-11	4	7	5	-2	9	-11	4
	Medio	-10	4	-8	4	-8	3	3	7
	Alto	-11	3	-7	3	-10	3	-3	4
NVP	Bajo	-8	6	-11	6	-1	7	-5	6
	Medio	-11	6	-7	7	-7	5	-9	3
	Alto	-14	6	-6	9	-10	5	-5	5
AZT	Bajo	6	3	8	8	4	2	-4	6
	Medio	-8	5	-9	5	4	5	-3	6
	Alto	-4	4	-11	5	-1	4	-6	3

5.5.3.4 Estabilidad en matriz

La estabilidad de los ARVs en el plasma humano se evaluó a temperatura ambiente (4,5 h), post-procesamiento (9,5 h en inyector automático), después de tres

ciclos de congelado-descongelado y a largo plazo (199 días a -20 °C). Las estabilidades se evaluaron en los niveles de CC bajo y alto excepto para la estabilidad a largo plazo que se realizó en los niveles bajo, medio y alto. Se consideró a los ARVs estables en plasma humano o extractos ya que el error relativo porcentual estuvo dentro de ± 15 de su valor nominal. Las determinaciones se realizaron con la técnica de MS². En la Tabla 5.11 se presentan los resultados de los ensayos de estabilidad para los analitos en estudio.

Tabla 5.11: Estabilidad de los ARVs en plasma humana a diferentes condiciones.

Valor nominal de los CC (Bajo, Medio y Alto)		Temperatura ambiente (4,5 h)	Inyector automático (9,5 h)	Congelado- Descongelado (3 ciclos)	Largo plazo (199 días)
Analito	ng.mL ⁻¹	ER %	ER %	ER %	ER %
3TC	67,7	-3,2	-12,8	12,1	5,3
	2317,0				-11,5
	3707,7	-7,3	-11,7	-8,4	-12,7
NVP	63,5	-5,2	11,0	-4,1	7,5
	2206,0				6,6
	3529,6	-9,9	9,9	-10,0	4,9
AZT	63,1	11,3	12,6	10,5	4,7
	2190,4				2,4
	3504,6	5,1	14,4	2,7	8,9

5.5.4 Comparación de las metodologías bioanalíticas de MS² y MS³

Para cada analito en estudio se analizó la especificidad contra componentes normales de la matriz biológica, analitos y EI. Respecto de las cifras analíticas de mérito se comparó el rango lineal, sensibilidad, sensibilidad analítica, exactitud y precisión.

La sensibilidad de calibración (pendiente de la recta de calibrado) no es adecuada para comparar dos métodos analíticos cuando están basados en respuestas diferentes (MS² y MS³). Para ello es preferible utilizar la llamada sensibilidad analítica γ (Skoog y col., 2001), definida por la relación entre la sensibilidad de calibración (SEN) y el ruido instrumental (S_y):

$$\gamma = \frac{SEN}{S_y}$$

Ecuación 20

En la Tabla 5.12 se presentan las cifras analíticas de mérito de las técnicas utilizadas para cuantificar 3TC, NVP y AZT en plasma humano.

Ambas técnicas son específicas, pero MS³, debido a que posee una fragmentación adicional, permite que las interferencias en los tiempos de retención de los analitos sean menores, aumentando de esta manera la especificidad. El rango lineal de ambas metodologías analíticas es óptimo para aplicarlas a ensayos farmacocinéticos de dichos ARVs (Marier y col., 2007).

Tabla 5.12: Cifras analíticas de mérito de las técnicas MS² y MS³ para la cuantificación de 3TC, NVP y AZT en plasma humano.

Parámetro	Analito	Metodología bioanalítica	
		MS ²	MS ³
Especificidad	3TC	Los blancos de plasma presentan menor interferencia en la técnica de MS ³ .	
	NVD		
	AZT		
Rango lineal (ng.mL ⁻¹)	3TC	24 - 4.030	
	NVD	25 - 4.130	
	AZT	25 - 4.090	
Sensibilidad * (mL.ng ⁻¹)	3TC	$y = 0,000195 x + 0,00072$	$y = 0,000151 x + 0,00076$
	NVD	$y = 0,000540 x + 0,00503$	$y = 0,000348 x + 0,00128$
	AZT	$y = 0,000051 x - 0,00021$	$y = 0,000219 x + 0,00416$
Sensibilidad analítica (γ) (mL.ng ⁻¹)	3TC	14	4,3
	NVD	25	12
	AZT	20	5,0
Veracidad y Precisión Intra-día (ER%, CV%)	3TC	-11, 4	-8, 5
	NVD	-14, 6	-11, 7
	AZT	-8, 5	-11, 8
Veracidad y Precisión Inter-día (ER%-CV%)	3TC	-10, 9	-11, 7
	NVD	-10, 7	-9, 6
	AZT	4, 5	-6, 6

*: Todas las regresiones lineales presentaron valores de $r > 0,99$. Para exactitud y precisión se tuvieron en cuenta los mayores valores de ER y CV para cada analito.

En relación a la sensibilidad se pudo apreciar que 3TC y NVP disminuyó la pendiente de calibración al pasar de la técnica de MS² a MS³ excepto para AZT la cual aumentó. A pesar que la técnica de MS³ posee un paso adicional de fragmentación así como el AZT, el EI también estuvo sujeto a esa fragmentación adicional y al graficar las relaciones de áreas ($\text{Área}_{\text{Analito}}/\text{Área}_{\text{EI}}$) generó un aumento de esta relación para AZT en la técnica de MS³ a pesar de que menos iones llegaron al detector.

El parámetro γ se interpreta mejor en términos de su inversa indicando de esta manera la menor diferencia de concentración que puede apreciarse a lo largo del intervalo de aplicación de la técnica analítica haciendo a la técnica MS³ más favorable en este sentido.

Respecto a los valores de veracidad y precisión intra e inter día, ambas técnicas presentaron valores similares siendo ambas apropiadas para cuantificar 3TC, NVP y AZT en plasma humano con exactitud y precisión.

5.6 Conclusiones

Se desarrollaron y validaron 2 metodologías bioanalíticas por LC-MS² y LC-MS³ para cuantificar 3TC, NVP y AZT en plasma humano utilizando FTC como EI.

Ambas metodologías bioanalíticas resultaron ser específicas, sensibles, precisas y exactas de acuerdo a los requerimientos de agencias regulatorias. El procesamiento de muestra permitió llegar al vial de HPLC con una solución con bajo contenido de matriz disminuyendo de esta manera la supresión iónica. Esto permitió acortar el tiempo de análisis asegurando la posibilidad de disponer secuencias cromatográficas con gran cantidad de inyecciones, todo esto sin afectar el rango lineal necesario para aplicar las metodologías a estudios de farmacocinética comparada.

Las cifras analíticas de mérito estuvieron dentro de los criterios de aceptación de las guías de validación, nacional e internacionales (ANMAT, 2005; Anvisa, 2003; USFDA, 2001) con la diferencia que la metodología de LC-MS³ presentó una mejor especificidad lo cual está directamente relacionado a una segunda fragmentación respecto de la metodología de LC-MS².

6. CONCLUSIONES FINALES

El control de calidad para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en fluidos biológicos, hizo necesario desarrollar metodologías bioanalíticas para su aplicación sobre muestras reales provenientes de estudios de biodisponibilidad comparada. Para tal fin se desarrollaron y validaron 4 metodologías bioanalíticas por HPLC-UV y/o HPLC-MS/MS para la cuantificación de Abacavir (ABC), Efavirenz (EFV), Emtricitabina (FTC), Lamivudina (3TC), Nelfinavir (NFV), Nevirapina (NVP), Tenofovir (TFV) y Zidovudina (AZT) en plasma humano. Las metodologías aplicadas a los estudios de biodisponibilidad fueron evaluadas y aprobadas por la autoridad sanitaria nacional (ANMAT), siendo esto un requisito indispensable para su implementación en el análisis de muestras provenientes de un estudio de bioequivalencia.

Se desarrolló y validó una metodología bioanalítica por HPLC-UV con sensibilidad suficiente de manera de poder describir la farmacocinética de EFV, que por las características del detector (UV) fue necesario profundizar conceptos cromatográficos con el fin de separar el analito de la matriz, llegar al límite de cuantificación necesario y poder cuantificar un elevado número de muestras en cada secuencia cromatográfica. Las metodologías por espectrometría de masas (MS) permitieron cuantificar varios ARVs en tiempos de corridas relativamente cortos y con límites de cuantificación acordes a las farmacocinéticas evaluadas, siendo muy útiles para el análisis de una gran cantidad de muestras.

Se profundizaron conocimientos en diferentes técnicas de preparación de muestras adecuadas para utilizar con los sistemas de detección utilizados en este trabajo de tesis. Los lineamientos respecto del procesamiento de muestras estuvieron dirigidos esencialmente a 3 objetivos: facilidad de procesamiento, concentración y limpieza de matriz. Para esto último se emplearon distintas técnicas analíticas incluyendo precipitación de proteínas, extracción de punto nube y extracción en fase sólida respectivamente. Cada una de ellas pudo ser aplicada a la determinación de diferentes ARVs en plasma humano. Si bien cada una de ellas posee ventajas y desventajas todas permiten cumplir con las exigencias de las regulaciones nacionales e internacionales respecto de validación de metodologías bioanalíticas aplicables a estudios de

bioequivalencia. En particular, podría decirse que la metodología basada en la precipitación de proteínas sería la metodología de elección para determinar antirretrovirales en plasma humano por HPLC-UV y HPLC-MS/MS debido a facilidad, velocidad y costos de procesamiento. Estas características son las deseadas cuando se requiere procesar un gran número de muestras. Es importante tener en cuenta que el límite de detección alcanzado sería más elevado dado que conlleva dilución, lo cual puede ser la limitante de su aplicación. La metodología de preparación de muestras basada en SPE permite concentrar la muestra y obtener una sensibilidad mayor de la metodología analítica general, aunque es más laboriosa y costosa. En el caso de la cuantificación de Tenofovir en plasma humano para estudios de BE, sería la metodología de elección dada las condiciones contextuales de trabajos y las exigencias regulatorias. La metodología de preparación de muestras basada en CPE permite concentrar la muestra, es laboriosa, aunque económica; pero la solución resultante luego de la extracción no es la mejor matriz para inyectar en un LC-MS/MS dado la supresión iónica que causan los tensioactivos en la fuente de electronebulización, como así también por alta probabilidad de ensuciar el espectrómetro de masas luego de varias inyecciones.

La importancia y proyección de la espectrometría de masas (MS) es debida a su potencial analítico ya que proporciona especificidad, elevada sensibilidad, versatilidad, aplicabilidad a diferentes tipos de muestras y en combinación con técnicas de separación de alta resolución, es la más apropiada para analizar muestras complejas reales. Además, el avance de tecnológico en esta área permite disponer de espectrómetros de masas cada vez más sofisticados. La fortuna de disponer de un equipo como el SCIEX 5500 QTRAP[®], posibilitó desarrollar una metodología de MS³ y comparar las cifras analíticas de mérito con la metodología convencional de MS² siendo ambas adecuadas para cumplir con los requerimientos de las diversas autoridades sanitarias.

Los retos analíticos son cada vez mayores dado que si bien la tecnología juega un rol importante en la etapa del análisis, la logística analítica requerida para la preparación de muestra es sofisticada debido fundamentalmente a la complejidad de trabajar con muestras reales que generalmente se disponen en pequeñas cantidades, particularmente de origen biológico, para separar, identificar y cuantificar compuestos similares, presentes en concentraciones trazas. En este sentido queda mucho camino por

recorrer y gracias a la incorporación de un nuevo instrumento (SCIEX 6500 QTRAP ® SelexION) se trabajará en el campo de la cuantificación de analitos con presencia de relaciones similares de m/z para un espectrómetro de triple cuadrupolos. No obstante, debido a los equipos sofisticados, en muchos casos se olvida que se utiliza un procedimiento analítico, por lo que es importante recordar que para evitar errores se requiere calidad analítica y no sólo instrumental.

En los últimos años ha habido un aumento en la cantidad de ensayos clínicos siendo los estudios de farmacocinética comparada los de más auge dentro del sector farmacéutico. El diseño de los mismos es tan importante como la necesidad de disponer de metodologías bioanalíticas adecuadas para poder cuantificar con exactitud y precisión los diferentes analitos y concluir si dos formulaciones farmacéuticas pueden ser intercambiadas en la práctica médica. Todo esto sumado a las exigencias regulatorias en cuanto al registro de fármacos antirretrovirales, fueron los pilares para focalizar los diferentes desarrollos y cumplir con los objetivos planteados en la presente tesis.

Se adquirió conocimiento y experiencia en lo que respecta a ensayos clínicos de farmacocinéticas comparadas, ya sea desde la perspectiva del diseño del mismo teniendo en cuenta el tipo de ensayo, la cantidad de voluntarios, el muestreo, etc. A través del análisis de muestras reales y del análisis estadístico de las mismas se logró comprender la importancia de la necesidad de interacción entre las áreas analítica, clínica y estadística ya que la posibilidad de describir una curva farmacocinética depende literalmente de la interrelación de estas 3 áreas en la redacción de un protocolo clínico. Se pudo demostrar que no todas las formulaciones farmacéuticas son intercambiables en la práctica médica siendo los estudios de bioequivalencia un eslabón muy importante en cuanto a la calidad de productos farmacéuticos siempre que sea necesario. Es imprescindible contar en el mercado con productos que hayan demostrado poseer una calidad biofarmacéutica adecuada para ser considerados entre las opciones terapéuticas que se ofrecen a un paciente, de manera que éste pueda optar, con el consejo de profesionales médicos y farmacéuticos, por la terapéutica que mejor se adapte a sus posibilidades o preferencias.

En lo que respecta a desafíos futuros nuestro trabajo estará centrado en cuantificar ARVs así como también otros fármacos por espectrometría de masas de triple cuadrupolos en tándem aplicando otros procesamientos de muestras no solo a

plasma sino también en sangre. En esta sentido abordaremos algunas de las aplicaciones clínicas del uso de sangre total seca recogida en papeles de filtro (DBS, dried blood spots), permitiendo implementar métodos más baratos y prácticos de obtención, almacenaje y transporte de muestras biológicas y/o sanguíneas aplicables tanto a estudios de bioequivalencia así como también monitoreo terapéutico.

Bibliografía

- Abdelhay, M. H., Gazy, A. A., Shaalan, R. A., & Ashour, H. K. (2013). Simple spectrophotometric methods for determination of tenofovir fumarate and emtricitabine in bulk powder and in tablets. *Journal of Spectroscopy*, *1*(1), 41–54. <http://doi.org/10.1155/2013/937409>
- Aggleton, P., & Mazín, R. (2000). Ya se dispone de antirretrovíricos contra el VIH y el sida: ¿Es necesaria ahora la prevención? *Revista Panamericana de Salud Pública*, *7*(3). <http://doi.org/10.1590/S1020-49892000000300014>
- Agrahari, V., & Youan, B. B. C. (2012). Sensitive and rapid HPLC quantification of tenofovir from hyaluronic acid-based nanomedicine. *AAPS PharmSciTech*, *13*(1), 202–10. <http://doi.org/10.1208/s12249-011-9735-6>
- Akhil, D., Shivanand, D., Savalia, A., Santosh, N., Patra, A., & Kotha, S. K. (2014). Pharmacokinetic and safety evaluation of two fixed dose tablets of emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate. *International Journal of Inventions in Pharmaceutical Sciences*, *1*, 600–606.
- Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, *12*(3), 413–20. <http://doi.org/10.1023/A:1016212804288>
- AMM. (2013). Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos (pp. 1–9).
- Anastas, P. T. (1999). Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *29*(3), 167–175. <http://doi.org/10.1080/10408349891199356>
- ANMAT. (2001). Disposición ANMAT N° 3311 / 2001 (con la modificación de la Disposición ANMAT N° 1277 / 2002).
- ANMAT. (2005). Disposición 4844/2005. Normativa aplicable a la etapa analítica para la realización de Estudios de Biodisponibilidad - Bioequivalencia, (Cmi).
- ANMAT. Disposición 5040/06. Régimen de buenas prácticas para la realización de estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia. (2006).

- ANMAT. (2009). Disposición 758/2009: Criterios de Bioexención de Estudios de Bioequivalencia para medicamentos sólidos orales de liberación inmediata. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- ANMAT. (2010). Disposición 6677/10. Régimen de buena práctica clínica para estudios de farmacología clínica índice, 1–45.
- Anvisa. (2003). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial Da União*, 1–12.
- Ardrey, R. E. (2003). *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons, Ltd. <http://doi.org/10.1002/0470867299>
- Bedor, D. C. G., De Souza Filho, J. H., Ramos, V. L. S., Gonçalves, T. M., Miranda, C. E., & De Santana, S. E. D. P. (2011). A sensitive and robust Lc-Ms/Ms method with monolithic column and electrospray ionization for the quantitation of efavirenz in human plasma: Application to a bioequivalence study. *Química Nova*, 34(6), 950–955. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600007>
- Blum, M. R., Chittick, G. E., Begley, J. a, & Zong, J. (2007). Steady-State Pharmacokinetics of Emtricitabine and Tenofovir Disoproxil Fumarate Administered Alone and in Combination in Healthy Volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 47(6), 751–759. <http://doi.org/10.1177/0091270007300951>
- Cappiello, A. (2006). Advances in LC-MS Instrumentation. *Journal of Chromatography Library*, 72, 65–85.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Moreno-Cordero, B., Pérez-Pavón, J. ., García-Pinto, C., & Fernández Laespada, E. (2000). Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 251–265. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00837-2](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00837-2)
- Charbe, N., Baldelli, S., Cozzi, V., Castoldi, S., Cattaneo, D., & Clementi, E. (2016). Development of an HPLC–UV assay method for the simultaneous quantification of nine antiretroviral agents in the plasma of HIV-infected patients. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(6), 396–403. <http://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.05.008>
- Cheng, J., Zhou, Y., Zuo, M., Dai, L., & Guo, X. (2010). Application of dispersive

- liquid-liquid microextraction and reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of two fungicides in environmental water samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90(11), 845–855. <http://doi.org/10.1080/03067310903180468>
- Chiu, M. L., Lawi, W., Snyder, S. T., Wong, P. K., Liao, J. C., & Gau, V. (2010). Matrix Effects—A Challenge Toward Automation of Molecular Analysis. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 15(3), 233–242. <http://doi.org/10.1016/j.jala.2010.02.001>
- Cole, R. B. (2010). *Electrospray and MALDI mass spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*. (I. John Wiley & Sons, Ed.) (Vol. 2nd).
- Colombo, S., Béguin, A., Marzolini, C., Telenti, A., Biollaz, J., & Decosterd, L. a. (2006). Determination of the novel non-peptidic HIV-protease inhibitor tipranavir by HPLC-UV after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 832(1), 138–43. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.040>
- Cuevas, M. J., Perez, M. del R., Ortiz de Urbina, J., Ortega, L., Canto, M., & Martín, V. (2002). Utilidad de las determinaciones de niveles plasmáticos de los fármacos antirretrovirales en el manejo de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Emergentes*, 4(1), 30–35.
- D'Arrigo, C., Migliardi, G., Santoro, V., & Spina, E. (2006). Determination of olanzapine in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Therapeutic Drug Monitoring*, 28(3), 388–393. <http://doi.org/10.1097/01.ftd.0000211800.66569.c9>
- D'Avolio, A., Ibañez, A., Sciandra, M., Siccardi, M., de Requena, D. G., Bonora, S., & Di Perri, G. (2006). Validation of liquid/liquid extraction method coupled with HPLC-UV for measurement of ribavirin plasma levels in HCV-positive patients. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 835(1–2), 127–130. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.019>
- Dailly, E., Raffi, F., & Jolliet, P. (2004). Determination of atazanavir and other antiretroviral drugs (indinavir, amprenavir, nelfinavir and its active metabolite M8, saquinavir, ritonavir, lopinavir, nevirapine and efavirenz) plasma levels by high

- performance liquid chromatography with UV detecti. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 813(1–2), 353–358. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.10.005>
- Donnerer, J., Kronawetter, M., Kapper, A., Haas, I., & Kessler, H. H. (2003). Therapeutic drug monitoring of the HIV/AIDS drugs abacavir, zidovudine, efavirenz, nevirapine, indinavir, lopinavir, and nelfinavir. *Pharmacology*, 69(4), 197–204. <http://doi.org/10.1159/000073664>
- Droste, J. A. H., & Aarnoutse, R. E. (2007). Determination of emtricitabine in human plasma using HPLC with fluorometric detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 30(18), 2769–2778. <http://doi.org/10.1080/10826070701560900>
- DrugBank. (2016). Retrieved from <https://www.drugbank.ca/drugs>
- Ekman, R., Silberring, A., & Westman-Brinkmalm, A. (2009). *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*. John Wiley & Sons.
- Fandaruff, C., Rauber, G. S., Araya-Sibaja, A. M., Pereira, R. N., de Campos, C. E. M., Rocha, H. V. A., ... Cuffini, S. L. (2014). Polymorphism of Anti-HIV Drug Efavirenz: Investigations on Thermodynamic and Dissolution Properties. *Crystal Growth & Design*, 14(10), 4968–4975. <http://doi.org/10.1021/cg500509c>
- Flexner, C. (2007). Antirretrovíricos y tratamiento de la infección por VIH. In *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica* (11th ed., pp. 1273–1313). México: McGraw Hill.
- Fontana, A. R., Camargo, A. B., & Altamirano, J. C. (2010). Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1217(41), 6334–41. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.021>
- Fontana, A. R., Silva, M. F., Martínez, L. D., Wuilloud, R. G., & Altamirano, J. C. (2009). Determination of polybrominated diphenyl ethers in water and soil samples by cloud point extraction-ultrasound-assisted back-extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1216(20), 4339–46. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.029>

- Fox, D., O'connor, R., Mallon, P., & McMahon, G. (2011). Simultaneous determination of efavirenz, rifampicin and its metabolite desacetyl rifampicin levels in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(4), 785–791. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.07.041>
- Gallant, J. E., DeJesus, E., Arribas, J. R., Pozniak, A. L., Gazzard, B., Campo, R. E., ... Cheng, A. K. (2006). Tenofovir df, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *New England Journal of Medicine*, 354(3), 251–260. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa051871>
- Giokas, D. L., Sakkas, V. A., Albanis, T. A., & Lampropoulou, D. A. (2005). Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography-mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction. *Journal of Chromatography A*, 1077(1), 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.074>
- Gomes, N. A., Pudage, A. M., Joshi, S. S., Vaidya, V. V., & Parekh, S. a. (2008). LC–MS–MS Method for simultaneous analysis of abacavir and lamivudine in human plasma, and its application to a bioequivalence study. *Chromatographia*, 68(7–8), 541–550. <http://doi.org/10.1365/s10337-008-0789-x>
- Gomes, N. A., Vaidya, V. V., Pudage, A., Joshi, S. S., & Parekh, S. A. (2008). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method for simultaneous determination of tenofovir and emtricitabine in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(3), 918–926. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.07.022>
- Gross, J. H. (2011). *Mass Spectrometry, A Textbook*. Germany: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-10711-5>
- Grupo de trabajo sobre tratamientos del VIH (gTt). (2014). Retrieved from http://gtt-vih.org/files/active/0/Tabla_ARV_2014.pdf
- Han, F., Yin, R., Shi, X., Jia, Q., Liu, H., Yao, H., ... Li, S. (2008). Cloud point extraction-HPLC method for determination and pharmacokinetic study of flurbiprofen in rat plasma after oral and transdermal administration, 868, 64–69. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.024>
- Hocart, C. H. (2010). *Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification*

- and Quantification*. (E. Ltd., Ed.) (Vol. 9). <http://doi.org/DOI: 10.1016/B978-008045382-8.00187-8>
- Hoffmann, E. de, & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry, Principles and Applications* (Third Edit). England: John Wiley & Sons Ltd. <http://doi.org/10.1039/9781847551306>
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (1996). Guideline for good clinical practice E6(R1). *ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996(4)*, i-53. <http://doi.org/10.1056/NEJMp1012246>
- Kim, E. J., & Shah, D. O. (2002). Cloud point phenomenon in amphiphilic drug solutions. *Langmuir*, *18*(26), 10105–10108.
- Knox, C., Law, V., Jewison, T., Liu, P., Ly, S., Frolkis, A., ... Wishart, D. S. (2011). DrugBank 3.0: a comprehensive resource for “omics” research on drugs. *Nucleic Acids Research*, *39*(Database issue), D1035-41. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq1126>
- Lakshmi Sailaja, A., Kishore Kumar, K., Ravi Kumar, D. V. R., Mohan Kumar, C., Yugandhar, N. M., & Srinubabu, G. (2007). Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of efavirenz in human plasma. *Chromatographia*, *65*(5–6), 359–361. <http://doi.org/10.1365/s10337-006-0170-x>
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Principles of biochemistry*. (Macmillan, Ed.) (4th ed.).
- Llibre, J. M., Antela, A., Arribas, J. R., Domingo, P., Gatell, J. M., López-Aldeguer, J., ... Clotet, B. (2010). El papel de las combinaciones de antirretrovirales a dosis fijas en el tratamiento de la infección por VIH-1. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *28*(9), 615–620. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.08.004>
- LoBrutto, R., & Kazakevich, Y. (2007). *HPLC for Pharmaceuticals Scientists* (Yuri Kazak). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Maggiolo, F. (2007). Drug Evaluation. *Pharmacother*, *8*, 1137–1145.
- Maggiolo, F. (2009). Efavirenz: A decade of clinical experience in the treatment of HIV. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *64*(5), 910–928. <http://doi.org/10.1093/jac/dkp334>

- Maravilla, E. C., & Jiménez, A. V. (2004). El descubrimiento del VIH en los albores de la epidemia del SIDA. *Revista de Investigación Clínica*, 56(2), 130–133.
- Marier, J. F., Dimarco, M., Guilbaud, R., Dodard, C., Morelli, G., Tippabhotla, S. K., ... Monif, T. (2007). Pharmacokinetics of lamivudine, zidovudine, and nevirapine administered as a fixed-dose combination formulation versus coadministration of the individual products. *Journal of Clinical Pharmacology*, 47(11), 1381–9. <http://doi.org/10.1177/0091270007307572>
- Marier, J. F., Morin, I., Al-Numani, D., Stiles, M., Morelli, G., Tippabhotla, S. K., ... Monif, T. (2006). Comparative bioavailability of a generic capsule formulation of the reverse transcriptase inhibitor efavirenz and the innovator product. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 44(4), 180–184. <http://doi.org/10.5414/CP44180>
- Martindale, W., & Kathleen, P. (2009). *The complete drug reference*. (cop. 1999 Pharmaceutical Press, Ed.) (Thirty-six). London.
- Marzo, A., & Balant, L. P. (1995). Bioequivalence. An updated reappraisal addressed to applications of interchangeable multi-source pharmaceutical products. *Arzneimittel-Forschung*, 45(2), 109–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7710428>
- Mathias, A. A., Hinkle, J., Menning, M., Hui, J., Kaul, S., & Kearney, B. P. (2007). Bioequivalence of efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate single-tablet regimen. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 46(2), 167–173. <http://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181427835>
- Matthews, C. Z., Woolf, E. J., Mazenko, R. S., Haddix-Wiener, H., Chavez-Eng, C. M., Constanzer, M. L., ... Matuszewski, B. K. (2002). Determination of efavirenz, a selective non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using HPLC with post-column photochemical derivatization and fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(5), 925–934. [http://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00709-9](http://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00709-9)
- Mediavilla, A., & Flórez, J. (1997). *Farmacología humana. Farmacología clínica dermatológica* (3rd ed.). Barcelona: Masson, S.A.
- Melnyk, A., Wolska, L., & Namieśnik, J. (2014). Coacervative extraction as a green

- technique for sample preparation for the analysis of organic compounds. *Journal of Chromatography A*, 1339, 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.082>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica (4a Ed)*. Madrid: Prentice Hall.
- Miura, J., Ishii, H., & Watanabe, H. (1976). Extraction and separation of nickel chelate of 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol in nonionic surfactant solution. *Bunseki Kagaku*, 25(11), 808–809.
- Mogatlé, S., & Kanfer, I. (2009). Rapid method for the quantitative determination of efavirenz in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(5), 1308–12. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.008>
- Montoya, R. (2015). Annals Graphic Medicine - Sign Out. *Annals of Internal Medicine*, 163(7), W141. <http://doi.org/10.7326/G15-0003>
- Murray, K. K., Boyd, R. K., Eberlin, M. N., Langley, G. J., Li, L., & Naito, Y. (2013). Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)*. *Pure and Applied Chemistry*, 85(7), 1515–1609. <http://doi.org/10.1351/PAC-REC-06-04-06>
- Narang, V. S., Lulla, A., Malhotra, G., & Purandare, S. (2005a). A combined-formulation tablet of lamivudine/nevirapine/stavudine: bioequivalence compared with concurrent administration of lamivudine, nevirapine, and stavudine in healthy Indian subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, 45(3), 265–74. <http://doi.org/10.1177/0091270004273343>
- Narang, V. S., Lulla, A., Malhotra, G., & Purandare, S. (2005b). Pharmacokinetic profiling and bioequivalence evaluation of 2 lamivudine tablet formulations after single oral administration in healthy human Indian volunteers. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 38(5), 566–9. <http://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31800126334-200504150-00009> [pii]
- Nirogi, R., Bhyrapuneni, G., Kandikere, V., Mudigonda, K., Komarneni, P., Aleti, R., & Mukkanti, K. (2009). Simultaneous quantification of a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor emtricitabine and a nucleotide reverse transcriptase inhibitor tenofovir in plasma by liquid chromatography positive ion. *Biomedical Chromatography*, 23(4), 371–

381. <http://doi.org/10.1002/bmc.1125>

Pawliszyn, J., & Lord, H. L. (Eds.). (2010). *Handbook of Sample Preparation. Handbook of Sample Preparation.*

Pisconti, M. Z., & Huanca, J. C. (2015). Preconcentración de plomo en muestras sintéticas por extracción con tritón X-114 en el punto de nube y análisis por absorción atómica (EAAF). *Rev Soc Quím Perú*, 81(1), 1–11.

Podany, A. T., Sheldon, C., Grafelman, D., & Ohnmacht, C. M. (2015). Assay development for determination of tenofovir in human plasma by solid phase analytical derivatization and LC-MS/MS. *Bioanalysis*, 7(24), 3085–95. <http://doi.org/10.4155/bio.15.220>

Quattrocchi, O. A., Abelaira de Andrizzi, S., & Laba, R. F. (1992). *Introduccion a la HPLC Aplicacion y Practica.* Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA.

Rabel, S. R., Maurin, M. B., Rowe, S. M., & Hussain, M. (1996). Determination of the pKa and pH-solubility behavior of an ionizable cyclic carbamate, (S)-6-chloro-4-(cyclopropylethynyl)-1,4-dihydro-4-(trifluoromethyl)-2H-3,1-benzoxazin-2-one (DMP 266). *Pharmaceutical Development and Technology*, 1(1), 91–95. <http://doi.org/10.3109/10837459609031422>

Ramachandran, G., Kumar, A. K. H., Swaminathan, S., Venkatesan, P., Kumaraswami, V., & Greenblatt, D. J. (2006). Simple and rapid liquid chromatography method for determination of efavirenz in plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 835(1–2), 131–135. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.014>

Rezk, N. L., Tidwell, R. R., & Kashuba, A. D. M. (2003). Simultaneous determination of six HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors and nevirapine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B*, 791(1–2), 137–147. [http://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00224-1](http://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00224-1)

Rower, J. E., Klein, B., Bushman, L. R., & Anderson, P. L. (2012). Validation of a sensitive LC/MS/MS method for the determination of zidovudine and lamivudine in human plasma. *Biomedical Chromatography: BMC*, 26(1), 12–20. <http://doi.org/10.1002/bmc.1617>

- Rubinson, K. a., & Runbinson, J. F. (2001). *Analisis Instrumental 2001*. Madrid: Prentice Hall.
- SAFYBI. (2016). Anmat : Investigación clínica. *Asociación Argentina de Farmacia Y Bioquímica Industrial*, 56(152), 24–26.
- Saitoh, T., & Hinze, W. L. (1995). Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins. *Talanta*, 42(1), 119–127. [http://doi.org/10.1016/0039-9140\(94\)00227-J](http://doi.org/10.1016/0039-9140(94)00227-J)
- Shemirani, F., Dehghan, S., Rahnama, R., Salavati, M., & Alsadat, A. (2004). The application of cloud point extraction for the preconcentration and speciation of chromium by flame atomic absorption spectrometry. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy, Volume 49(1)*, 31–36.
- Sirimanne, S. R., Patterson, D. G., Ma, L., & Justice, J. B. (1998). Application of cloud-point extraction-reversed-phase high-performance liquid chromatography. A preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 716(1–2), 129–37.
- Skoog, D. A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental* (Sexta). Cengage Learning.
- Skoog, D. A., Holler, J. F., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de análisis instrumental* (Quinta). Madrid: McGraw Hill.
- Sládková, V., Dammer, O., & Kratochvíl, B. (2016). Solid Forms of Tenofovir Disoproxil Fumarate, Their Mutual Conversion, and Stabilization of Form I in Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(10), 3136–3142. <http://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.07.002>
- Smallwood, I. M. (1996). *Handbook of Organic Solvent Properties*. New York: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-052378-1.50026-8>
- Sosa Ferrera, Z., Padrón Sanz, C., Mahugo Santana, C., & Santana Rodríguez, J. J. (2004). The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(7), 469–479. [http://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00732-0](http://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00732-0)
- Stalikas, C. (2007). Single-drop microextraction followed by in-drop derivatization for

- the analysis of organic compounds by gas chromatography. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 8(1), 72–74.
- Takahashi, M., Yoshida, M., Oki, T., Okumura, N., Suzuki, T., & Kaneda, T. (2005). Conventional HPLC method used for simultaneous determination of the seven HIV protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcription inhibitor efavirenz in human plasma. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(7), 1286–1290. <http://doi.org/10.1248/bpb.28.1286>
- Theron, A., Cromarty, D., Rheeders, M., & Viljoen, M. (2010). Determination of salivary efavirenz by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(28), 2886–2890. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.08.051>
- Thompson, M. A., Aberg, J. A., Cahn, P., Montaner, J. S. G., Hammer, S. M., Hirsch, M. S., ... Schooley, R. T. (2015). Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection. *Journal American Medical Association*, 304(3), 321–333.
- United State Pharmacopoeia. (2014). Validation of Compendial Procedures. *The United States Pharmacopoeia XXXVII: The National Formulary XXXII*, 1–5.
- USFDA. (2001). *Guidance for industry. Bioanalytical method validation*.
- USFDA. (2006). *Drugs @ FDA : FDA Approved Drug Products*.
- USFDA. (2013). *Guidance for industry. Bioanalytical method validation.*, (September).
- USFDA. (2014a). *Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection*, 1–4.
- USFDA. (2014b). *Bioavailability and bioequivalence studies submitted in NDAs or INDs - General considerations (Draft). FDA Guidance for Industry*, (March). Retrieved from <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm389370.pdf>
- Wanner, K. T., & Höfner, G. (Eds.). (2007). *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry: Applications in Drug Discovery*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://doi.org/10.1002/9783527610907>
- Waters corporation. (2014). *Care and Use Manual, oasis HLB Cartridges and 96-well*

plates. *Methods*, 1–4.

- Wentao, L., Kaishun, B., Xiao, L., Juanjuan, Z., & Xiaohui, C. (2009). Cloud-Point Extraction Combined with LC–MS for Analysis of Memantine in Rat Plasma. *Chromatographia*, 69(9–10), 837–842. <http://doi.org/10.1365/s10337-009-1027-x>
- WHO, UNICEF, & UNAIDS. (2011). Global HIV/AIDS Response Progress Report 2011. <http://doi.org/ISBN 978 92 4 150298 6>
- Xiao, L., Xiao Hui, C., Yuan Yuan, Z., Wen Tao, L., & Kai Shun, B. (2007). Determination of arbidol in rat plasma by HPLC-UV using cloud-point extraction. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 856(1–2), 273–7. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.06.009>
- Yadav, M., Gupta, A., Singhal, P., & Shrivastav, P. S. (2010). Development and validation of a selective and rapid LC-MS-MS method for the quantification of abacavir in human plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 48(8), 654–662. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819295>
- Yadav, M., Singhal, P., Goswami, S., Pande, U. C., Sanyal, M., & Shrivastav, P. S. (2010). Selective determination of antiretroviral agents tenofovir, emtricitabine, and lamivudine in human plasma by a LC-MS-MS method for a bioequivalence study in healthy Indian subjects. *Journal of Chromatographic Science*, 48(9), 704–713. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20875231>
- Yazdi, A. S. (2011). Surfactant-based extraction methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(6), 918–929. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.010>
- Yeni, P. G., Hammer, S. M., & Hirsch, M. S. (2012). Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection. *Journal American Medical Association*, 308(4), 251–265. <http://doi.org/10.1001/jama.2012.7961>
- Zhang, D., Fu, Y., Gale, J. P., Aubry, A. F., & Arnold, M. E. (2009). A sensitive method for the determination of entecavir at picogram per milliliter level in human plasma by solid phase extraction and high-pH LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(4), 1027–1033. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.02.003>
- Zhu, X., Zhu, X., & Wang, B. (2006). Cloud point extraction for speciation analysis of inorganic tin in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry.

Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 21(2), 69.
<http://doi.org/10.1039/b507236k>