



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN FARMACOLOGÍA BÁSICA

TESIS

***DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN
MÉTODO PARA CUANTIFICAR NIVELES
PLASMÁTICOS DE PEREZONA***

PRESENTA

Q.F.B. BLANCA NATERAS MARÍN

DIRECTOR DE TESIS

D.C. VIRGINIA A. ROBINSON FUENTES

CO-DIRECTOR

D.C. ALFONSO EFRAÍN CAMPOS SEPÚLVEDA

MORELIA, MICHOACÁN MÉXICO
2007

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	7
1. Perezona	7
1.1. Propiedades fisicoquímicas	7
1.2. Medicina tradicional	8
1.3. Actividad biológica	8
2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	9
2.1. Composición de fase móvil	10
2.2. Influencia del tamaño de partícula en la columna	11
2.3. Solventes	11
2.4. Cromatografía de líquidos en fase reversa	13
2.5. Parámetros cromatográficos	13
2.5.1. Tiempo de retención t_R	14
2.5.2. t_M	14
2.5.3. Factor de retención k'	14
2.5.4. Factor de separación α	15
3. Validación	15
3.1. Validación de métodos analíticos	15
3.1.3.1. Selectividad	16
3.1.3.2. Curva de calibración	16
3.1.3.3. Recobro absoluto	17
3.1.3.4. Límite de cuantificación	17
3.1.4. Precisión	18
3.1.4.1. Repetibilidad	18
3.1.4.2. Reproducibilidad	18
3.1.4.3 Exactitud	19
4. Métodos de cuantificación de quinonas	20
III. JUSTIFICACION	21
IV. OBJETIVOS	22
1. Objetivo general	22
2. Objetivos específicos	22
V. MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. Reactivos	23
2. Material biológico	23
3. Métodos	23
3.1. Desarrollo del método analítico	23
3.1.1. Disolución de la perezona	23
3.1.2. Barrido espectrofotométrico	24
3.1.3. Desproteínización de sangre Total y de plasma	24
3.1.4. Extracción de la perezona	24
3.1.5. Ensayo de distribución	25
3.1.6. Porcentaje de recuperación	25
3.2. Desarrollo del método por HPLC	26
3.2.1. Composición de la fase móvil	26

3.3. Validación del sistema cromatográfico	26
3.3.1. Linealidad del sistema	26
3.4. Validación del método cromatográfico	26
3.4.1. Parámetros de validación	27
A) Selectividad	27
B) Linealidad	27
C) Precisión y Exactitud	27
D) Límite de cuantificación	28
3.5. Medición de concentraciones plasmáticas	28
3.5.1. Tratamiento quirúrgico	28
3.5.2. Toma de muestra	28
3.5.3. Tratamiento de la muestra	29
VI. RESULTADOS	30
1. Disolución de la perezona	30
2. Barrido espectrofotométrico	30
3. Desproteización	31
4. Extracción de la perezona	31
5. Ensayo de distribución	32
6. Porcentaje de recuperación	32
7. Validación del sistema por HPLC	33
7.1. Linealidad del sistema	33
7.1.1. Variabilidad interdía	34
8. Desarrollo del método	34
8.1. Condiciones cromatográficas	35
8.2. Selectividad	36
8.3. Linealidad	37
8.4. Precisión y Exactitud	38
8.5. Límite de cuantificación	40
9. Niveles plasmáticos	40
VII. DISCUSIÓN	42
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. PERSPECTIVAS	50
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO 1	59

RESUMEN

La perezona es una *p*-benzoquinona sesquiterpénica, aislada de las raíces de las plantas del género *Perezia* (*Acourtia*). En la medicina tradicional mexicana el cocimiento de las raíces de estas plantas ha tenido usos como: laxante, antiparasitario y antitumoral.

Se han realizado diversos estudios sobre la actividad biológica de la molécula, de los realizados en animal integro, se ha observado un efecto cardioprotector durante la reperfusión para la rata cuando se le ha producido isquemia cardiaca, así mismo en un estudio sobre presión arterial en rata anestesiada se observó hipotensión y bradicardia. También se le ha estudiado ampliamente desde el punto de vista químico, tanto a nivel nacional como internacional y aún hoy en día siguen apareciendo datos en la literatura, acerca de plantas que contienen el compuesto.

Si bien es cierto que se ha encontrado actividad biológica de la perezona tanto “*in vivo*”, “*in vitro*”, como a nivel de organelo celular, aún no existen en la literatura científica reportes de un método analítico que permita cuantificar los niveles plasmáticos de la perezona en rata, lo que haría posible realizar estudios de fármaco-toxicológicos.

En el presente trabajo se desarrolló y validó un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), empleando una columna de fase reversa C₁₈ y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo: buffer de acetato de amonio 0.05 M pH 3.5 (70:30 v/v). La detección del compuesto se realizó mediante un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 400 nm.

El aislamiento del compuesto se realizó a partir de una micromuestra de sangre total, la cual se extrajo con acetato de etilo, evaporando el disolvente por calentamiento en baño de agua a 50±2° C bajo fuente de nitrógeno. Para la cuantificación por HPLC, el residuo se reconstituyó con 50 µL de etanol absoluto.

La curva de calibración presentó linealidad en un rango de 20-200 µg/mL con un coeficiente de determinación de 0.99 y un límite de cuantificación de 3.125 µg/mL. Se emplearon 3 puntos de control bajo, medio y alto, encontrando una Desviación Estándar Relativa (DER) < 15 %, tanto para la variabilidad intradía (repetibilidad), como para la variabilidad interdía (reproducibilidad), cumpliendo con los parámetros de validación que establece la Norma Oficial Mexicana.

En conclusión el método es sencillo, preciso y exacto, por lo tanto es un método útil para cuantificar niveles plasmáticos de la perezona en sangre de rata, por lo que puede ser utilizado en estudios farmacocinéticos.

I. INTRODUCCIÓN

Desde sus inicios el hombre ha buscado en la naturaleza respuestas a sus problemas de salud, tomando elementos de aquella para prevenir enfermedades o bien para el restablecimiento de la salud. Así, desde la época prehispánica, han sido las plantas la base de la medicina tradicional mexicana. Las culturas de Mesoamérica tenían un amplio conocimiento de la herbolaria, en la que fundamentaban su medicina, que era practicada por los chamanes, médicos y/o sacerdotes, los que mezclaban la práctica médica con rituales mágico-religiosos (Baytelman, 1993). A la llegada de los españoles al Nuevo Mundo, éstos se sorprendieron del uso de las plantas medicinales para tratar las enfermedades. El reporte mas importante, del uso de las plantas medicinales de aquellos tiempos en nuestro país, es el Códice de la Cruz-Badiano (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*), escrito en 1552 por Martín de la Cruz y traducido al Latín por Juan Badiano, donde recoge los conocimientos médicos de esta cultura precolombina (Rzedowski, 1981).

Otro reporte sobre plantas medicinales, es la “Historia General de la Nueva España” de Fray Bernardino de Sahagún. Estos conocimientos empíricos han sido tradicionalmente transmitidos durante siglos por los indígenas de los 56 grupos étnicos de nuestro país y muchos de ellos aún persisten hasta nuestros días (Rzedowski 1981).

En 1890, en México se crea el Instituto Médico Nacional, dedicado al estudio científico de las plantas medicinales (Gómez-Pompa, 1993). La biodiversidad en México representa el cuarto lugar a nivel mundial, con mayor variedad de plantas y diferentes ecosistemas lo que permite estudiar una gran diversidad de plantas, siendo consideradas como un recurso natural, abundante, barato y fácil de conseguir.

Particularmente en el estado de Michoacán, el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (I.I.Q.B.) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, desde su creación en el año de 1976, se ha enfocado entre otros proyectos a la obtención de principios activos de las plantas medicinales de la región (Anuario del I.I.Q.B., 1986); entre éstas se encuentran las plantas del

género *Perezia* (género que actualmente recibe el nombre de *Acourtia*), de la familia de las compuestas, de las cuales se aisló la perezona.

II. ANTECEDENTES

1. Perezona

La perezona es una benzoquinona sesquiterpénica natural (Figura 1), obtenida de las plantas del género *Perezia* (*Acourtia*) y *Junguia*. Fue aislada originalmente en 1852 de las raíces del pipitzahoac (voz Náhuatl de la planta) por el Doctor Leopoldo Río de la Loza, quien la llamó Ácido Pipitzahoico (Ramírez, 1894; Joseph-Nathan, 1968, 1974).

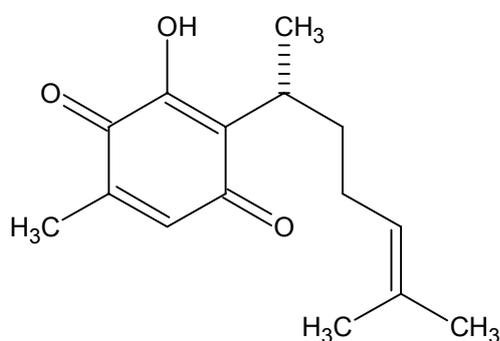


Figura 1. Estructura de la perezona [2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-3-hidroxy-5-metil-1,4-benzoquinona] (Walls y col., 1965).

1.1. Propiedades fisicoquímicas

La estructura química fue establecida por Fernando Walls y col., 1965, se presenta en forma de cristal, color amarillo-naranja con punto de fusión de 102-103° C (Enríquez y col., 1980), con un rendimiento de 5 a 6.5% (Altamirano, 1905; Enríquez y col., 1980) cuando se extrae del rizoma de la planta, tiene un pKa de 7.08, es altamente soluble en disolventes orgánicos (hexano, cloroformo, etc.) y prácticamente insoluble en agua.

Este compuesto ha sido ampliamente estudiado, desde el punto de vista químico, tanto a nivel nacional como internacional (Guo y col., 2005; Frontana y col., 2004; Bautista-Martínez y col., 2004; Aguilar-Martínez y col., 2001; Huipe-Nava y col., 2000; Burgueño -Tapia y col., 2000; Sánchez y col., 1985).

1.2. Usos en Medicina tradicional

En la medicina tradicional mexicana, la decocción de las raíces del pipitzahoac (vocablo Náhuatl para dicha planta) ha tenido usos como laxante, antiparasitario, antitumoral y emético (Martínez, 1969).

1.3 Actividad biológica

Se encuentran descritos estudios desde muy diversos puntos de vista, a continuación se describen los estudios biológicos más importantes realizados por diferentes grupos.

a) Estudios en animal íntegro

Se reportó la dosis letal₅₀ de la perezona (IP) en rata macho (23.9 mg/Kg) y ratón macho (44.2 mg/Kg) (Alcántara, 1981). A nivel cardiovascular a una dosis dentro del rango tóxico en rata anestesiada se observó un efecto hipotensor y bradicardia (Vidrio y Alcántara, 1992).

b) Estudios “*in vitro*”

En estudios previos se ha demostrado que la perezona afecta la actividad contráctil de ileón aislado de rata (Enríquez y col., 1980), a concentraciones bajas incrementa la contracción muscular, debido a un efecto sobre la membrana y/o una acción sobre los almacenes de calcio intracelular (García y col., 1995).

. También se ha sugerido que bloquea el flujo de calcio hacia la célula del músculo liso uterino (Perrusquía y col., 1991). Se observó un efecto relajante sobre el músculo liso vascular de aorta torácica precontraída con histamina, noradrenalina y a concentraciones altas de K⁺ (García y col., 1992).

c) Estudios en mitocondria

Se demostró que la perezona interfiere en el transporte electrónico en mitocondrias de hígado de rata; actividad debida a la gran similitud estructural que presenta con la ubiquinona (Coenzima Q10) (Cárabez, 1988), enzima que transfiere electrones hacia la cadena respiratoria, desde el complejo I (NADH) y el complejo II (succinato) (Mathews, 1998). Ésta actividad de la perezona fue demostrada también en levaduras mutantes deficientes de CoQ (Cárabez, 1988). Además inhibió la captura de Ca²⁺ por la mitocondria de la corteza adrenal de la rata (Cuéllar y col., 1987).

d) Efecto antiparasitario

Presenta efecto tripanosomicida sobre *Trypanosoma mega* y *Critidia fasciculata* (Molina-Portela y col., 1991, De Pahn y col., 1988).

e) Efecto antiagregante plaquetario

La perezona es capaz de inhibir la agregación de plaquetas humanas (De la Peña y col., 2001).

f) Efecto cardioprotector

Este efecto fue observado cuando se implementó un modelo experimental en rata albina, donde se ocluyeron los vasos que irrigan el corazón, posteriormente se administró perezona observándose una reducción en la incidencia de arritmias cardíacas y caída de la presión arterial (efecto cardioprotector), durante el proceso de la reperfusión (Téllez y col., 1999; Chávez, 2004).

g) Modelo Experimental

Recientemente se le ha propuesto como un modelo para evaluar la eficacia de fármacos analgésicos (efecto nociceptivo) (Guevara y col., 2004).

Por los reportes antes mencionado se conoce la actividad biológica de la perezona, sin embargo en la actualidad no existen datos referentes a los niveles plasmáticos de la perezona que serían de gran utilidad para el mejor conocimiento del comportamiento a nivel biológico de esta sustancia.

2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La HPLC fue desarrollada durante los últimos años de la década de los años 60's y los primeros años de los 70's. Hoy en día es ampliamente utilizada en la separación y purificación de mezclas de compuestos en áreas tan diversas como en las industrias farmacéutica, biotecnológica, alimenticia, de polímeros, así como en el estudio y control del medio ambiente (Quatrocchi, 1992).

La HPLC se realiza mediante la inyección de una pequeña cantidad de muestra en solución hacia una corriente de líquido móvil (fase móvil).

El instrumento está constituido por: los reservorios para la fase móvil, las bombas, el inyector, la columna de separación considerada “el centro del aparato”, el detector, y un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna y el sistema de registro del proceso cromatográfico (Figura 2).

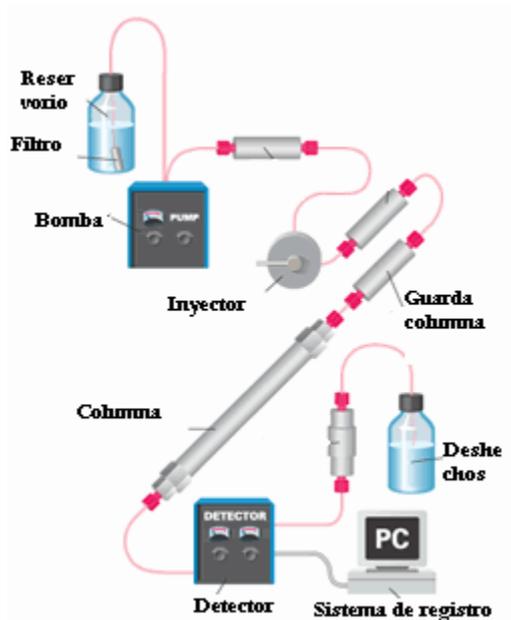


Figura 2. Representación esquemática del sistema cromatográfico

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos: el gráfico o cromatograma (Figura 3), que relaciona la respuesta del sistema cromatográfico con base en la concentración del soluto en función del tiempo de elución; el eluido o eluato, que es el fluido proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada, contiene la fase móvil e, idealmente los componentes de la muestra separados.

La separación en HPLC, está basada en la interacción y partición diferencial de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

2.1. Composición de la fase móvil. Elución isocrática y gradiente

En HPLC *isocrático* (la composición de la fase móvil no cambia en el transcurso de la corrida analítica), el analito es forzado a pasar a través de la columna por bombeo de la fase móvil a alta presión y es retardada por interacciones químicas específicas con la fase estacionaria, además depende de la naturaleza del analito, de la composición de la fase móvil y así como de la composición de la fase estacionaria.

Con frecuencia, la eficacia de la separación se aumenta empleando un *gradiente de elución*. En este caso se utilizan dos o tres sistemas disolventes con una polaridad significativamente distinta y varía la relación de los disolventes en forma programada, generalmente incrementando el disolvente con mayor gradiente de elución (Skoog, 2001).

2.2. Influencia del tamaño de partícula del soporte de la columna

La resolución de la cromatografía de líquidos mejora al disminuir el tamaño de partícula de la fase estacionaria. La eficacia de una columna empaquetada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas en HPLC es de 3-10 μm . Sí el soluto puede difundirse con rapidez entre las fases móvil y estacionaria, la altura equivalente de un plato teórico (HETP) disminuye y con ello la eficiencia de un tramo dado de columna aumenta. Entre más pequeñas son las partículas, mayor es el número de platos. Una razón por la cual las partículas pequeñas originan mejor resolución es que permiten un flujo más uniforme a través de la columna, reduciendo así el término de camino múltiple (A) de la ecuación de van Deemter. Otra razón es que el camino que debe recorrer el soluto en su difusión en la fase móvil que hay entre las partículas es del orden del tamaño de las partículas. Entre más pequeñas son las partículas, menor es la distancia en la que debe difundirse el soluto en la fase móvil. Este efecto disminuye el término C de la ecuación-de van Deemter, correspondiente al tiempo finito de difusión.

El precio de utilizar partículas muy finas es la resistencia al flujo. Por tanto, es necesario emplear alta presión para forzar el paso del líquido a través de la columna (Harris, 2001).

2.3. Solventes

La fase móvil en HPLC cumple un papel fundamental, ya que puede por sí misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a la vez, el verdadero “motor” en la fase reversa. Teniendo en cuenta que el detector de HPLC más utilizado es el espectrofotométrico es habitual elegir un solvente “transparente” a la longitud de onda de trabajo. Esta transparencia puede evaluarse por la longitud de onda de corte λ_c , es decir, la

longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una cubeta de 10 mm de paso óptico, es igual a la unidad de absorbancia empleando aire como referencia (ver Tabla 1)

Los solventes empleados en esta técnica cromatográfica deben ser de alta pureza, esto con el fin de no degradar las columnas y evitar el ruido en el detector, además deben ser desgasificados para eliminar la producción de burbujas. Los solventes más comúnmente empleados son: agua, acetonitrilo (AcN), metanol (MeOH), y tetrahidrofurano (THF), los cuales se pueden emplear en forma individual o bien como mezclas entre ellos, logrando con ello mejores separaciones, al variar la proporción y composición de los solventes (Quatrocchi, 1992).

Tabla 1. Serie eluotrópica y longitudes de onda de corte en el ultravioleta (UV) de los disolventes, en cromatografía de adsorción sobre sílice

Disolvente	Fuerza eluyente	λ (nm)
Pentano	0,00	190
Hexano	0,01	195
Heptano	0,01	200
Triclorotrifluoroetano	0,02	231
Tolueno	0,22	284
Cloroformo	0,26	245
Diclorometano	0,3	233
Éter dietílico	0,43	215
Acetato de etilo	0,48	256
Éter metil <i>t</i> -butílico	0,48	210
Dioxano	0,51	215
Acetonitrilo	0,52	190
Acetona	0,53	330
Tetrahidrofurano	0,53	212
2-Propanol	0,60	205
Metanol	0,70	205

El corte en el ultravioleta del agua es 190 nm.

FUENTES: L. R. Snyder en *High-Performance Liquid Chromatography* (C. Horváth, ed.), Vol. 3 (New York: Academic Press, 1983); *Burdick & Jackson Solvent Guide*, 3a ed. (Muskegon, MI: Burdick & Jackson Laboratories, 1990.) Tomado de Harris, 2001

2.4. Cromatografía de líquidos de fase reversa (RPLC)

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. La retención es el resultado de la interacción de los componentes no polares de los solutos y de la fase estacionaria no polar. Se emplean básicamente dos tipos de fases estacionarias: la más común es enlazar grupos no polares en la sílica gel (tratadas con RMe_2SiCl), tales como: $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ y de estos la cadena (R) de 18 carbonos ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}$) es la más comúnmente usada. El segundo tipo de fase estacionaria empleada en cromatografía de líquidos de fase reversa está compuesta por grupos de polímeros orgánicos (poliestireno y divinilbenceno) (Rubinson, 2001).

El valor del pH de la fase móvil es un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables, y en algunos casos debe controlarse rigurosamente. El pH de una solución acuosa aumenta cuando se adiciona un modificador orgánico. Además se debe tener en cuenta que a valores de pH mayores a 7.5 se disuelve la sílice de base de las columnas y a valores de pH menores a 2, debido a que se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada (unión siloxano) (Quatrocchi, 1992).

Los solventes son mezclas polares de solventes orgánicos (metanol, acetonitrilo) con agua, a los que se podrá agregar aditivos, como sales inorgánicas, orgánicas, mixtas. La fuerza eluotrópica (fuerza con la que interacciona con el analito) del solvente aumenta por la adición del solvente menos polar (Harris, 2001). A mayor proporción del modificador orgánico corresponde menor capacidad retención (k') y a mayor proporción de agua, mayor capacidad retención.

Los solventes de mayor empleo en RPLC son, además del agua, el metanol, el acetonitrilo y el tetrahidrofurano (Quatrocchi, 1992).

La HPLC de fase reversa es adecuada para separar mezclas de compuestos orgánicos neutros o bien compuestos con carga y de bajo peso molecular.

2.5. Parámetros cromatográficos

En la figura 3 se muestra un cromatograma característico de separación de dos componentes de una mezcla (A y B). La cromatografía como cada rama de la ciencia química tiene un lenguaje particular, la cual se va a enumerar y describir a continuación:

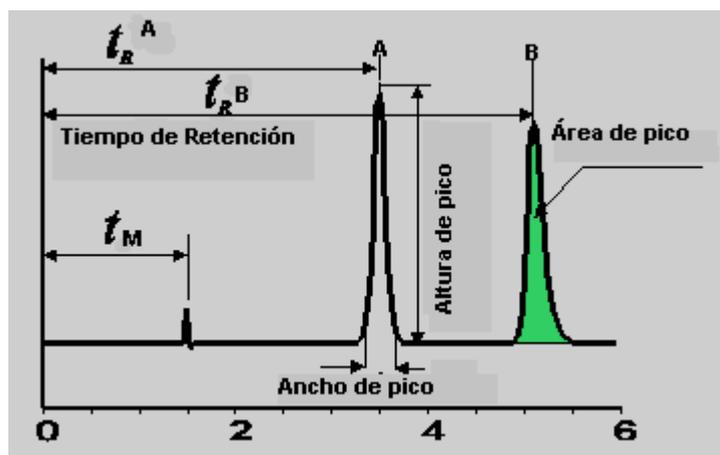


Figura 3. Cromatograma característico de una mezcla de dos componentes (A y B).

2.5.1. Tiempo de Retención (t_R)

Es el tiempo que transcurre entre el momento de aplicación de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza su máximo de detección por el sistema.

2.5.2. t_M

Es el tiempo que le toma a la especie no retenida pasar a través de la columna y alcanzar el detector. La velocidad de migración de la especie no retenida coincide con la velocidad promedio del movimiento de las moléculas de la fase móvil (Skoog, 2001).

2.5.3. Factor de retención K'

También llamado “factor de capacidad”, describe la velocidad de desplazamiento del analito sobre la columna. Se puede calcular de la siguiente manera para el analito A

$$k'_A = t_R - t_M / t_M$$

El factor de retención “ideal” de un analito es entre 2 y 10 (Skoog, 2001).

2.5.4. Factor de separación (selectividad) α

Es el cociente entre los factores de retención o de capacidad (K') de un par de picos. Describe la separación entre dos especies (A y B) sobre la columna, bajo ciertas condiciones experimentales.

$$\alpha = K'_B / K'_A$$

Donde K'_B es el coeficiente de retención de la especie mas retenida.

Cuando no existe separación, α es igual a la unidad, y su valor aumenta cuando aumenta la separación.

3. Validación

Criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia o biodisponibilidad. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-2004. SECRETARÍA DE SALUD

3.1. Validación de métodos analíticos.

La validación de los métodos analíticos es el establecimiento de la evidencia experimental documentada de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de los atributos de calidad previamente establecidos.

Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas de un estudio de bioequivalencia deben ser validados en el sitio de análisis y para el propósito, independientemente si son metodologías desarrolladas por la unidad analítica o se adquieren comercialmente, como es el caso de los métodos basados en técnicas inmunológicas u otras.

3.1.1. Se deberá contar con una descripción detallada del método analítico a seguir, en el que se deberán establecer los criterios de aceptación y rechazo de cada una de las etapas de la experimentación y sustentarlas científicamente.

3.1.1.1. Al preparar las soluciones patrón del fármaco en la matriz biológica, el volumen de disolvente no deberá exceder el 5% de volumen de fluido empleado para preparar cada concentración.

3.1.1.2. En el caso de emplear un estándar interno, se determinará el recobro de éste utilizando el mismo método analítico que para la sustancia de interés.

3.1.1.3. Cuando se obtengan concentraciones por encima del intervalo, la muestra podrá diluirse de modo que quede contenida en el intervalo de trabajo previamente establecido.

3.1.2. Las curvas de calibración y los puntos de control de calidad se deberán preparar en la misma matriz biológica que las muestras a analizar.

3.1.3. Una vez establecidas las condiciones analíticas, la validación del método deberá incluir como mínimo los parámetros que se describen a continuación:

3.1.3.1. Selectividad, es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar en la muestra.

Se establece la selectividad del método al analizar muestras blanco de la matriz biológica de por lo menos seis donadores. Evaluar en cada uno de los blancos, el método contra posibles interferencias en la concentración más baja de la curva de calibración (p. ej. Compuestos endógenos de la matriz biológica, anticoagulantes, Metabolitos en su caso y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante). No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.

3.1.3.2. Curva de calibración: es el conjunto de concentraciones que describen el rango en el cual se cuantifica el compuesto por analizar. La cual

se deberá establecer en función a las concentraciones esperadas del compuesto a analizar durante el análisis de las muestras. Se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por cinco concentraciones distintas cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima de la curva de calibración. Se deberá definir un modelo que describa adecuadamente la relación entre la concentración y respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo de la curva de calibración.

3.1.3.3. Recobro absoluto: se le llama así a la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

El recobro absoluto se deberá analizar al menos por triplicado, un mínimo de 3 concentraciones conocidas (baja, media y alta --puntos control--) del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Comparar estos resultados con la respuesta obtenida de los puntos control en solución.

Para calcular el porcentaje de recobro, dividir la respuesta obtenida de los puntos control en la matriz biológica entre la respuesta de los puntos control en solución y multiplicarlo por 100.

El porcentaje de recobro no deberá ser necesariamente del 100%, pero deberá ser consistente, preciso y reproducible en todo el intervalo de la curva de calibración.

3.1.3.4. Límite de cuantificación: el límite de cuantificación es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Se establece al analizar por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20% para métodos cromatográficos.

Para métodos inmunológicos debe considerarse $\pm 25\%$. Otros criterios distintos a éste, deben ser justificados.

3.1.4. Precisión: expresa el grado de concordancia o de dispersión entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

3.1.4.1. Repetibilidad: expresa la precisión de un método analítico y la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones de experimentación.

Se determina al analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración y deben estar incluidas en la curva de calibración. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15% en métodos cromatográficos; en los métodos inmunológicos, no debe ser mayor que el 20%. Cuando se cuantifiquen muestras en un estudio de bioequivalencia con métodos inmunológicos se analizarán las muestras por duplicado.

3.1.4.2. Reproducibilidad intralaboratorio: es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, o analistas

Se establece al analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, y deben estar incluidas en el intervalo de trabajo. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15% en métodos cromatográficos; en los métodos inmunológicos no debe ser mayor que el 20%.

3.1.4.3. Exactitud: es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Se determina cuando el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad están dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración en métodos cromatográficos, excepto los métodos inmunológicos que deben estar dentro del $\pm 20\%$.

La **linealidad** de un método analítico es su capacidad de arrojar resultados del análisis que sean proporcionales a la concentración del analito en las muestras, dentro de un rango dado.

La **precisión** es la variabilidad entre resultados de pruebas individuales, cuando el procedimiento se aplica de manera repetida, y se mide según el grado de repetibilidad y reproducibilidad. La exactitud es la cercanía de los resultados de los análisis obtenidos con el método y el valor verdadero.

4. Métodos de cuantificación de Quinonas por HPLC

Como se ha mencionado con anterioridad, no existen estudios relacionados con niveles de la perezona en plasma u otros fluidos biológicos, razón por la cual no existen métodos reportados para su determinación en este tipo de fluidos. Sin embargo, existen varias metodologías, en especial por HPLC, para determinar moléculas relacionadas como las quinonas. Por lo anterior, como punto de partida, se realizó una revisión de métodos para quinonas y así poder elegir las condiciones más adecuadas para determinar a la perezona en fluidos biológicos. La tabla 2 muestra ejemplos de métodos por HPLC para determinar quinonas en muestras diversas.

Tabla 2. Métodos cromatográficos para determinar y cuantificar quinonas

Analito	Columna analítica	Fase móvil	Detección nm	Velocidad mL/min	Tratamiento muestra	Autor y año
Idebenona	C ₁₈	MeOH:H ₂ O(70:30)	UV 280	1	HCl 6 mol/L/éter	Fan Z. et al., 1999
Idebenona LC/MS	Supelco C ₁₈	AcN: H ₂ O (80:20)	LC/MS (SIR)*	1	HCl 6 mol/L/CHCl ₃ /Hex (4:6)v/v	Hu et al., 2000
Coenzima Q ₁₀	ODS Hypersil C ₁₈ (HP)	MeOH:H ₂ O (9:1) MeOH:Propanol:Hex (2:1:1)	210-275	1.5	MeOH:éter de petróleo	Turumen et al., 1999
Idebenona	Nucleosil C ₁₈ Teknocrama	MeOH:H ₂ O (80:20) v/v Perclorato de litio 95%		1.2	Hexano	Artuch et al., 2002
Ubiquinonas	µBondapack C ₁₈ ODS	MeOH:Isopropanol: H ₂ O (75:20:5) gradiente de elución		1	Bacterias/solventes	Wayne Moss. 1983
Hidroquinona benzoquinona	ZorbaxCN	AcN: dihydrogen orthophosphate 0.01M	Fotodiodo 290, 245	1.5		Scobbie E. , Groves J.A., 1999

III. JUSTIFICACIÓN

La perezona es un compuesto presente en las raíces de las plantas del género *Perezia* (*Acourtia*), plantas que han tenido usos terapéuticos en la medicina tradicional mexicana.

Se ha investigado la actividad biológica de la perezona desde diversos puntos de vista. Sin embargo actualmente no se encuentran descritos en la literatura los métodos que permitan cuantificar los niveles plasmáticos de la molécula, aspectos que son la base de la terapéutica, por lo que en el presente trabajo se plantea un estudio que permitirá estimarlos y con ello generar las bases de los estudios fármaco-toxicológicos.

IV. OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método cromatográfico que permita cuantificar los niveles plasmáticos de la perezona en la rata.

IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar y validar un método cromatográfico (HPLC) para determinar los niveles plasmáticos de la perezona en rata.
2. Cuantificar los niveles plasmáticos de la perezona administrada por vía intraperitoneal IP.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos

Los reactivos empleados son grado reactivo analítico y grado HPLC según requerimientos.

La perezona fue donada por el laboratorio de Química "A" del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo.

2. Material biológico

Se emplearon Ratas macho Wistar (400-450g) proporcionadas por el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Los animales fueron trasladados al laboratorio 72 h antes de realizar el experimento, con el fin de habituarlos a las condiciones ambientales.

3. Métodos

3.1. Desarrollo del método analítico

3.1.1. Disolución de la perezona

Con la finalidad de encontrar un solvente capaz de disolver la perezona a una concentración adecuada para administrar una dosis alta y en poco volumen, se ensayaron diferentes disolventes como son: tween 80 al 1%, 5% y 10 % en agua destilada; dimetil sulfóxido, aceite de maíz, buffer de fosfatos a diferentes valores de pH y buffer de boratos a pH 9.0.

De igual forma se ensayó la disolución de perezona en disolventes orgánicos (etanol, cloroformo, acetato de etilo).

3.1.2 Barrido espectrofotométrico

Para encontrar la longitud de onda a la cual el compuesto presentaba su máxima absorción, se realizó un barrido espectrofotométrico (Spectronic 20 Genesys) de perezona disuelta en diferentes sistemas amortiguadores y disolventes orgánicos.

3.1.3 Desproteinización de sangre total y de plasma

La desproteinización se ensayó con dos volúmenes de acetonitrilo (AcN) por cada volumen de sangre total, ácido perclórico (50 μ L) por cada 100 μ L de sangre total y ácido tricloroacético al 15% tanto de sangre total como en plasma.

3.1.4 Extracción de la perezona de sangre de rata

Para realizar la extracción del compuesto de muestras sanguíneas de rata adicionadas con el compuesto. Se diseñó un experimento en el cual se sometía o no a la desproteinización con acetonitrilo.

Además de probar diferentes disolventes orgánicos, así como mezclas de ellos al 15%, diseño presentado en la tabla 3.

Tabla 3. Diseño experimental para establecer las condiciones de extracción de la perezona adicionada a muestras de sangre y detección por CCFA.

Procedimiento	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sangre(100 μ L)	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Perezona (100 μ g/mL)*	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Mezclar 1600 rpm/2'	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Desproteinizar (AcN 200 μ L)							√	√	√	√	√	√
Mezclar 1600 rpm/2'							√	√	√	√	√	√
Centrifugar 3500 rpm/5'	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Separar sobrenadante	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Extraer (200 μ L/ 3 veces)												
a) Hexano	√						√					
b) CHCl ₃		√						√				
c) AcOEt			√						√			
d) Hexano: CHCl ₃ (15%)				√						√		
e) Hexano:AcOEt (15%)					√						√	
f) Hexano: CH ₂ Cl ₂ (15%)						√						√

*Se adicionaron 5 μ L de esta concentración

Una vez realizado el proceso de extracción, la fase orgánica se llevó a casi sequedad en plancha de calentamiento con piedras de ebullición, el concentrado se aplicó sobre un cromatofolio de fase normal (sílica gel) y se corrió en una fase eluyente [hexano:AcOEt (9:1)].

El compuesto fue detectado por cromatografía en capa fina analítica CCFA, observando mediante luz UV de onda corta (254 nm) y larga (365 nm).

3.1.5 Ensayo de distribución

Los animales se administraron con una dosis de 30 mg/kg IP de perezona y se sacrificaron 30' después de la administración. Se tomaron muestras de hígado, intestino, cerebro, corazón y riñón.

Los órganos completos se pesaron y separó 1g de cada uno de ellos, se trituraron al máximo posible, se adicionó con 3 mL de solución salina isotónica, mezclando durante 1 min a 1600 r.p.m. Se separó por centrifugación (centrifuga clínica Clinaseal) a su máxima capacidad durante 10 min. El sobrenadante se extrajo con acetato de etilo, y la fase orgánica se evaporó a sequedad en plancha caliente con cuerpos de ebullición. Se analizó por CCFA, empleando como fase eluyente (hexano/acetato de etilo 9:1). Como estándar se empleó una solución de perezona en acetato de etilo, observando mediante luz UV de onda corta (254 nm) y larga (365 nm).

3.1.6. Porcentaje de recobro o de recuperación

El porcentaje de recobro se realizó mediante dos curvas de calibración empleando seis niveles de concentración (3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 y 100.0 µg/mL) por triplicado.

En la primera curva se utilizó como matriz agua de alta pureza y el analito disuelto en etanol absoluto. La segunda se empleó sangre de rata macho Wistar extraída por punción cardiaca adicionada con 5 µL perezona disuelta en etanol absoluto. A las dos curvas se les realizó una extracción líquido- líquido con tres alícuotas de 200 µL de acetato de etilo, mezclando en el vortex a 1600 r.p.m. durante dos minutos, separando las fases por centrifugación a 3500 rpm

durante 5 minutos, la fase extractiva fue secada con sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta sequedad en plancha de calentamiento. El residuo fue reconstituido con 50 μ L de etanol absoluto para su análisis cromatográfico, bajo las condiciones experimentales descritas en la tabla 7.

3.2. Desarrollo del Método Cromatográfico por HPLC

3.2.1 Composición de la fase móvil

Para encontrar la composición de la fase móvil se probaron soluciones 0.01 M y 0.05 M de acetato de sodio, de acetato de amonio y de citrato de sodio; también se varió el pH de 3.5, 4 y 5. Así como también se ensayaron diferentes proporciones de acetonitrilo (AcN) (iniciando con un 50% e incrementando paulatinamente el porcentaje).

Conocidas la estructura química, así como las propiedades fisicoquímicas de la perezona, con un peso molecular pequeño (menor de 2000) y el carácter ionizable de la molécula se empleó (RPLC) cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa.

3.3 Validación del sistema cromatográfico por HPLC

3.3.1. Linealidad del sistema

Con el objeto de validar el sistema cromatográfico se realizaron cinco curvas de calibración de perezona disuelta en etanol absoluto con pesadas independientes, empleando seis niveles de concentración (3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 y 100.0 μ g/mL), por quintuplicado, en un día y durante 3 días diferentes. Las distintas concentraciones se prepararon a partir de una solución stock de 100 μ g/mL.

3.4 Validación del método cromatográfico por HPLC

El método analítico de la perezona es validado para asegurar la confiabilidad del mismo con base a los criterios de validación señaladas en la norma oficial mexicana NOM-177-SSA 1- 2004.

3.4.1 Parámetros de Validación del método cromatográfico

a. Selectividad

La selectividad se determinó usando sangre de rata, obtenida por punción cardiaca de animales anestesiados en una cámara saturada con éter. A la sangre obtenida se le trabajó bajo dos condiciones experimentales. Por quintuplicado se realizó el proceso de extracción a 100 μL de sangre libre de fármacos, adicionada con 5 μL de etanol y se les denominó "blanco". Por otra parte de la misma manera se trabajó sangre libre de fármacos adicionada con 5 μL de una concentración conocida de perezona disuelta en etanol, empleando en la extracción 200 μL de acetato de etilo (tres alícuotas), la fase orgánica se evaporó bajo fuente de nitrógeno, a $50\pm 2^\circ\text{C}$ reconstituyéndola con 50 μL de etanol absoluto para la determinación de la concentración de la sustancia, empleando las condiciones cromatográficas determinadas con anterioridad para el sistema de análisis y cuantificación analítica.

b. Linealidad.

La linealidad del método se llevó a cabo preparando cinco curvas de calibración independientes con pesadas diferentes, en sangre de rata libre del compuesto, a la cual se le adicionaron concentraciones de 20 -200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las curvas se realizaron por quintuplicado en un mismo día. Se obtuvieron datos de linealidad como son: el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de correlación (r), la pendiente de la recta (m), y el valor del intercepto al eje "y" (b).

c. Precisión y Exactitud.

Para establecer la exactitud y la precisión se realizaron 5 curvas de calibración empleando 6 niveles de concentración (20-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con tres puntos de control de calidad, bajo, medio y alto (25, 50 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por quintuplicado en un solo día y por duplicado tres días diferentes. Se partió de una solución "stock", con una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se evaluó la precisión (DER %) y la exactitud del método tanto en un solo día, intradía, (repetibilidad), como en diferentes días, interdías (reproducibilidad).

d. Límite de Cuantificación

Se determinó por el análisis quintuplicado de muestras independientes a una concentración de 3.125 µg/mL.

3.5 Medición de las concentraciones plasmáticas de la perezona en rata

3.5.1 Tratamiento quirúrgico para canular la arteria caudal

Los animales fueron anestesiados en una cámara cerrada bajo una atmósfera de éter, durante el proceso quirúrgico se mantuvo la anestesia con un algodón impregnado con éter en el fondo de un vaso de precipitados que se instala cerca de las fosas nasales de la rata. Una vez bajo la influencia del anestésico se colocó al animal en un campo quirúrgico en decúbito dorsal. Se aseó con solución salina isotónica estéril en un área de aproximadamente cinco centímetros a partir de la base de la cola hacia el extremo de la misma. Se realizó una incisión de aproximadamente tres centímetros, para disecar la arteria caudal se empleó un disector de cristal, la cual se refirió con hilo de algodón. Para canular el vaso sanguíneo, se empleó un sistema punzocat 24G, una vez dentro se sujetó con hilo seda calibre “cero”. Se comprobó la viabilidad administrando solución salina isotónica y 0.1 mL de heparina para evitar la coagulación, se obstruyó la salida tapando con el complemento del punzocat hasta el momento de efectuar el muestreo. Se suturó la incisión, después se protegió con una gasa y cinta adhesiva.

Una vez recuperado de la anestesia, se le administró una dosis de la perezona de 60 mg/Kg IP, disuelta en aceite de maíz.

3.5.2 Toma de la muestra sanguínea.

La toma de la muestra se realizó con la rata inmovilizada (cámara de restricción). Se tomaron muestras de 100 µL de sangre a 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Ver la figura 4.



Figura 4. Fotografía del animal en la cámara de restricción

3.5.3 Tratamiento de la muestra.

Las muestras sanguíneas (100 μ L) obtenidas en los diferentes tiempos de muestreo se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, centrifugando a 5000 r.p.m durante 10 minutos. Realizando una extracción líquido- líquido con acetato de etilo, con alícuotas de 200 μ L en tres ocasiones sucesivas, agitando en un vortex a 1600 r.p.m. durante dos minutos para cada una de ellas y separando por centrifugación a 3500 r.p.m. durante cinco minutos en cada ocasión. La fase orgánica completa se evaporó bajo campana con una corriente de nitrógeno hasta sequedad a una Temperatura de $50\pm 2^\circ$ C. Los extractos se reconstituyeron con 50 μ L de etanol absoluto para la cuantificación del compuesto por HPLC.

VI. RESULTADOS

1. Disolución de la perezona

Los resultados obtenidos en la disolución de la perezona en los diferentes sistemas buffer y disolventes orgánicos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Solubilidad de la perezona en diferentes sistemas Buffer y solventes orgánicos

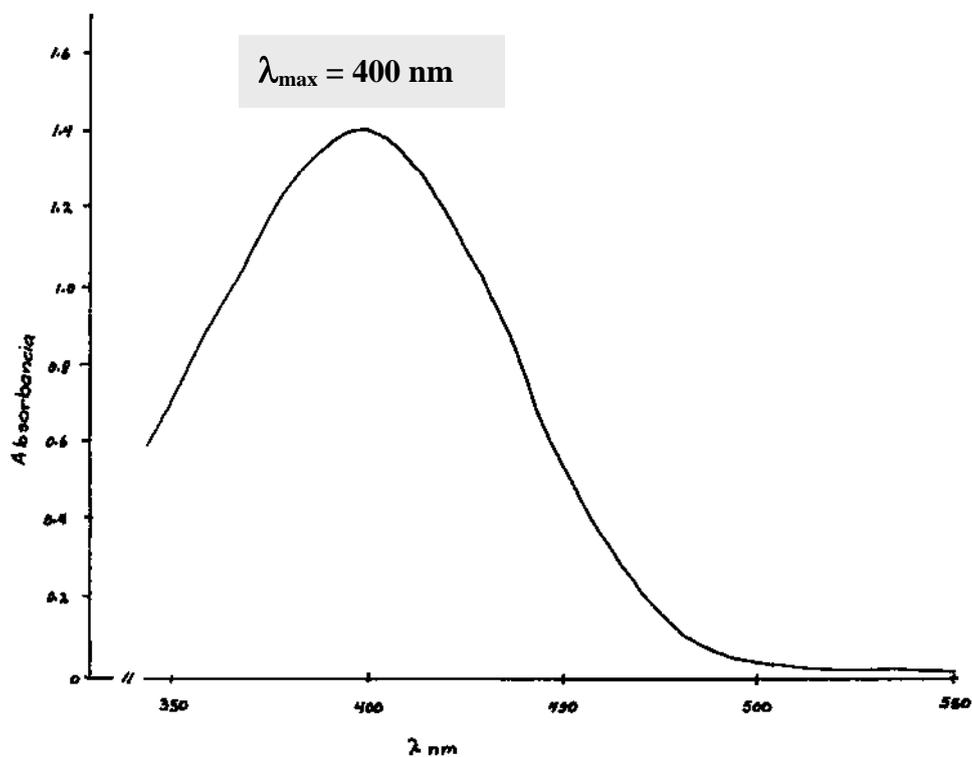
Disolvente	Concentración (mg/mL)
tween 80 1%	0.25
tween 80 5%	0.31
tween 80 10%	0.38
Buffer de fosfatos pH 6.0	Muy poco soluble
Buffer de fosfatos pH 7.4	0.24
Buffer de fosfatos pH 9.0	0.45
Aceite de maíz	40.00
Alcohol absoluto	40.00
Dimetil sulfóxido	200.00

2. Barrido espectrofotométrico

Tabla 5. Barrido espectrofotométrico. Longitud de onda máxima (λ_{max}) de absorción de perezona en los diferentes sistemas amortiguadores y disolventes

Solución buffer	pH	λ_{max} (nm)
Boratos	9.0	530
Fosfatos	7.4	530
Fosfatos	8.0	530
Fosfatos	9.0	530
Disolventes		
Hexano		400
Cloroformo		400
Etanol		400

Se muestra el gráfico correspondiente al barrido espectrofotométrico (Spectronic 20 Genesys) de la perezona en etanol



Gráfica 1. Barrido espectrofotométrico

3. Desproteinización de sangre total y de plasma

Después de probar diferentes métodos de desproteinización de la muestra, se observó que las proteínas no eran extraídas durante la extracción de la perezona y no representaban una interferencia en el análisis cromatográfico. Por lo tanto se decidió por no realizar dicha operación.

4. Extracción de la perezona en sangre de rata

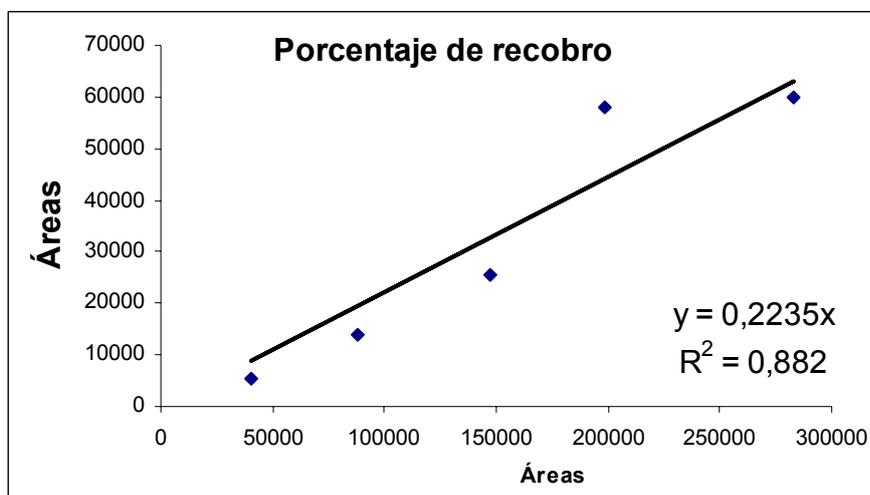
Los resultados del diseño experimental se presentan en este documento en el apartado de tratamiento de la muestra (p. 29).

5. Ensayo de distribución

Se observaron manchas amarillas visibles a la luz, se observaron también en luz U.V., correspondientes al Rf del estándar de perezona en los extractos realizados en hígado, intestino y cerebro. No encontrando estas manchas en riñón y corazón.

4. Porcentaje de recobro o de recuperación

Debido a que la perezona es una molécula altamente liposoluble, se requiere conocer el porcentaje de recuperación, de manera tal que son graficadas las respuestas del sistema cromatográfico para una curva de calibración de la perezona adicionada a la matriz contra las respuestas del detector para una curva de calibración para las distintas concentraciones de perezona disueltas en etanol, obteniendo una pendiente de 0.2235, lo que nos indica que hay un recobro del 22.35%. Dato de importancia en el momento de determinar los niveles plasmáticos de perezona. Resultados que se muestran en la gráfica 2.



$$m = 0.2235$$

Gráfica 2. Porcentaje de recobro de la perezona de sangre de rata

Tabla 6. Porcentaje de recuperación de acuerdo a la NOM-177-SSAI-2004

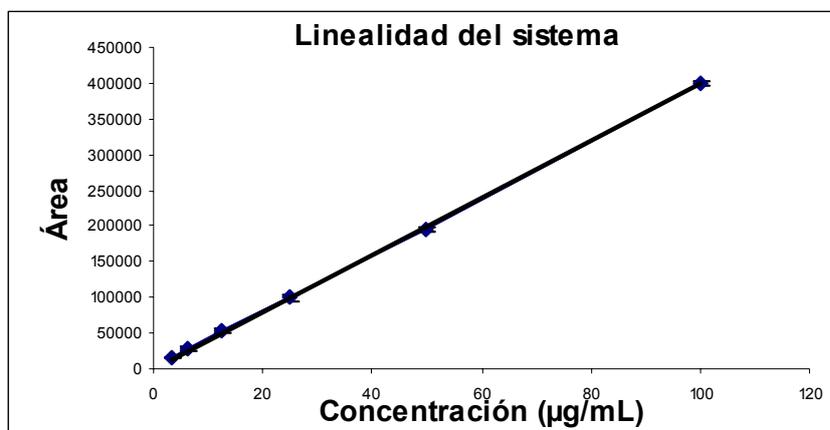
Concentración (µg/mL)	Área (perezona/etanol)	Desviación estándar	Área (perezona/etanol)	Desviación estándar
20	40067	4356.99	5270.66	1746.53
40	88152	32006.79	13741.33	4175.53
60	147643	41807.99	25407.66	13341.96
80	198347	11998.12	57884.00	22309.93
100	282835	93737.11	60040.66	31661.37

Concentración (µg/mL)	Porcentaje de recuperación
20	13.15
40	15.58
60	17.20
80	29.18
100	21.22

7. Validación del sistema cromatográfico por HPLC

7.1.- Linealidad del sistema

La validación del sistema se desarrolló de acuerdo a la norma oficial mexicana. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 3.

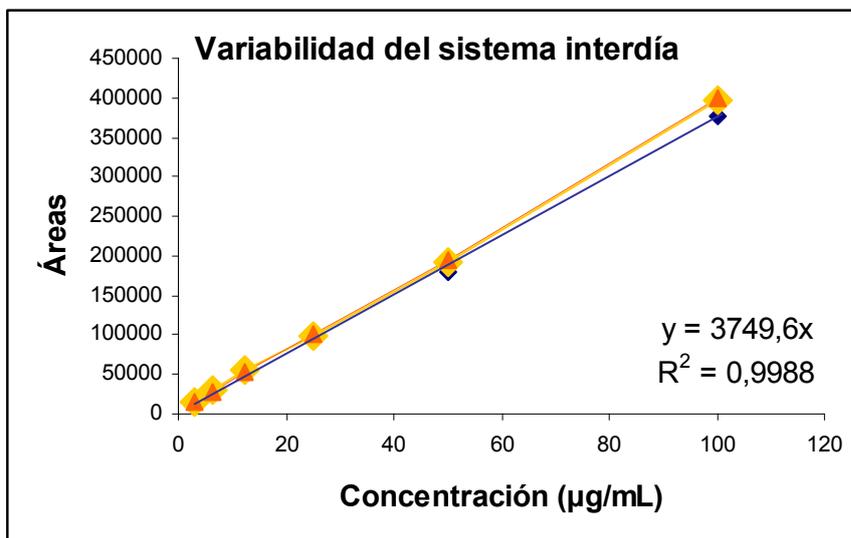
**Gráfica 3.** Linealidad del sistema cromatográfico

$$\begin{aligned}
 r &= 0.9998 \\
 R^2 &= 0.9997 \\
 b &= 2427.46 \\
 m &= 3947.33
 \end{aligned}$$

Como se puede apreciar en la gráfica 3, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.999, lo que permite afirmar que existe una respuesta lineal del detector para el intervalo de trabajo de concentraciones de perezona.

7.1.1. Variabilidad interdía

Se determinó así mismo la variabilidad interdía, en la gráfica 4 se presentan las curvas obtenidas en tres días sucesivos. Se observan solo dos rectas ya que en una de ellas se encuentran dos sobrepuestas.



Gráfica 4. Variabilidad interdía del sistema de tres curvas obtenidas en días sucesivos.

8. Desarrollo del método analítico

8.1 Condiciones cromatográficas

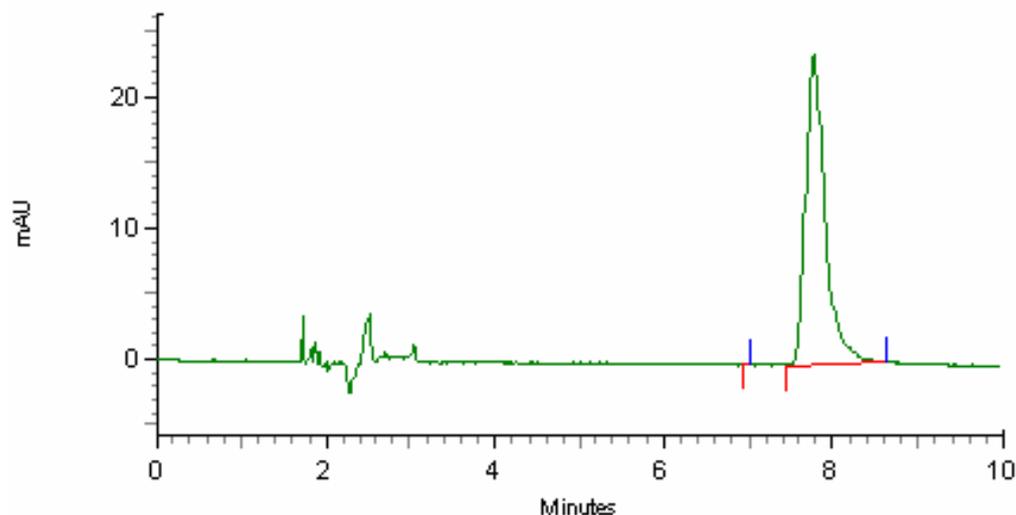
Se encontraron las siguientes condiciones cromatográficas (Tabla 7) que producen un pico de mejor simetría, en un t_R adecuado.

Tabla 7. Condiciones Cromatográficas

Analito	Perezona $t_R \approx 8$ min
Fase móvil	Acetonitrilo: Buffer de acetato de amonio 0.05 M pH 3.5 70:30 (v/v)
Fase estacionaria	Columna de fase reversa C ₁₈ (250 mm X 4.6 mm) ultraesphere de 5 μ m de partícula de Beckman Coulter
Velocidad de flujo	1 mL/min
Detector	Detector 168 System Gold con arreglo de diodos
Sistema	Bomba HPLC modelo 126, inyección manual, detección uv- vis a 400nm
Volumen de inyección	30 μ L
Tiempo de corrida	10 min
Límite de cuantificación	3.125 μ g/ mL

8.2 Selectividad del método cromatográfico

Los cromatogramas obtenidos se muestran en las gráficas 5 A y 5 B.



Gráfica 5.A. Cromatograma típico de la respuesta del sistema cromatográfico cuando se inyecta una concentración determinada de perezona disuelta en etanol absoluto

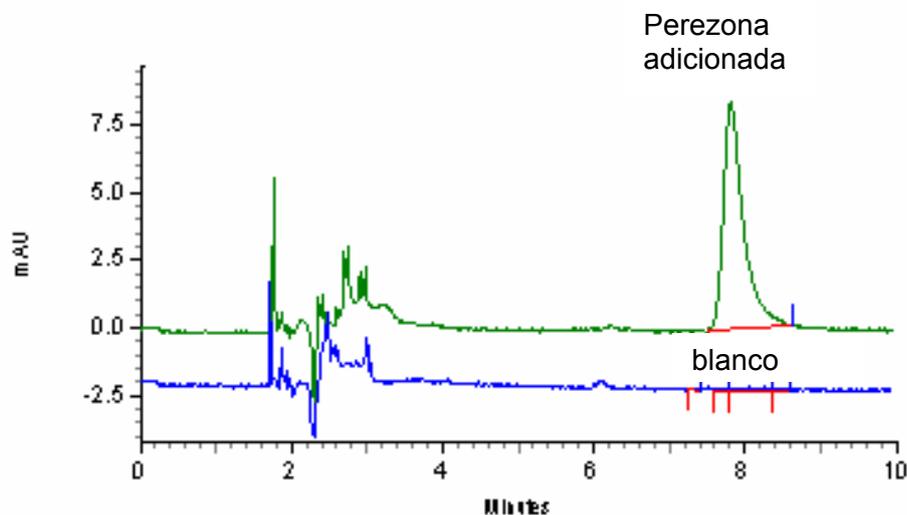


Gráfico 5 B. Cromatogramas representativos de las muestras blanco y de las muestras sanguíneas adicionadas con perezona

El cromatograma del gráfico 5 A muestra el pico de la perezona disuelta en Etanol, con un $t_R \approx 8$ minutos.

El gráfico 5 B presenta los cromatogramas obtenidos para las muestras “blanco” y para las muestras sanguíneas adicionadas con perezona,

representaciones gráficas donde se observa que no existe interferencia de sustancias endógenas propias de la matriz con el analito. Por lo que el método analítico para la perezona puede ser considerado como un método selectivo.

8.3 Linealidad del método cromatográfico

El diseño del estudio para establecer la linealidad del método cuando la perezona se adiciona a la sangre de rata y realizado el proceso de extracción, arrojó los siguientes resultados.

Al graficar los seis niveles de dosis contra la respuesta del sistema analítico representada en áreas de pico (Gráfico 6) se consideró que el método era lineal, cumpliendo con el criterio de aceptación, al tener un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9983$, y el coeficiente de correlación r con un valor de 0.9991 , la pendiente de $m = 347.00$.

La ecuación de la recta $y = 347.00x - 4247.80$ obtenida mediante la regresión lineal de los puntos experimentales nos permitió observar la excelente linealidad del método; y para cada uno de los puntos de calibración se obtuvo una Desviación Estándar Relativa (DER) $< 15\%$, como se muestra en la tabla 8. De acuerdo a los criterios de validación, el método cumple con el parámetro de la linealidad.

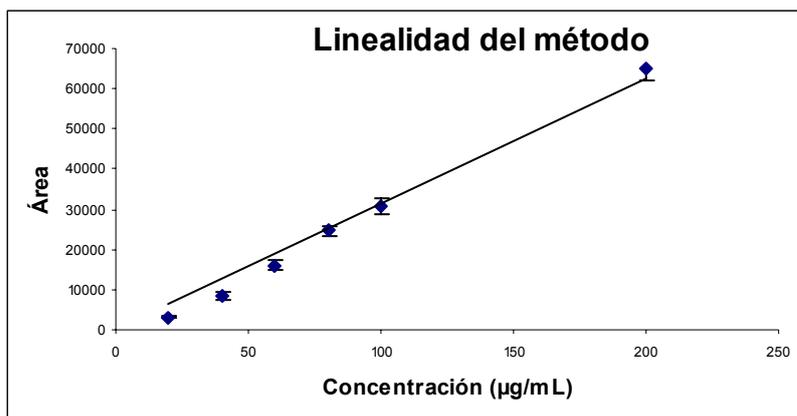


Gráfico 6. Linealidad del método

En este gráfico se está presentando una de las rectas de calibración obtenidas, donde se representa la respuesta del sistema cromatográfico a una serie de concentraciones crecientes de la perezona cuando es adicionada a sangre de rata.

8.4 Precisión y Exactitud

La precisión (DER%) y exactitud de la curva de calibración del método se evaluaron tanto en un solo día, intradía (repetibilidad) como en diferentes días interdía (reproducibilidad), los valores obtenidos se muestran en las siguientes tablas de resultados.

Tabla 8. Variabilidad Intradía obtenida para la curva de calibración (seis niveles de concentración con cinco réplicas por nivel) en muestras sanguíneas adicionadas con perezona.

Conc. Nominal µg/mL	Conc. Obs. µg /mL	DER (%)	Desviación (%) Conc. Real	Exactitud (%)
20	21.41	6.1	7.05	107.5
40	36.17	8.4	-9.58	90.42
60	58.63	6.6	-2.28	97.71
80	84.41	4.2	5.5	105.5
100	101.16	5.6	1.02	101.16
200	199	4.1	-0.5	99.5

Tabla 9. Variabilidad interdía obtenida para la curva de calibración (seis niveles de concentración con cinco réplicas por nivel) en muestras sanguíneas adicionadas con perezona.

Conc. Nominal µg/mL	Conc. Obs. µg /mL	DER (%)	Desviación (%) Conc. Real	Exactitud (%)
20	21.23	1.7	6.15	106.15
40	35.14	2.9	-12.15	87.85
60	58.23	3.3	-2.95	97.05
80	82.8	1.03	3.3	103.5
100	102.1	1.37	2.1	102.1
200	196	1.76	-2.0	98

En todos los casos la exactitud no fue estadísticamente distinta del 100 %, mientras que el DER (%) fue menor a 10%, por lo tanto cumplen con los criterios de validación establecidos para ambos parámetros.

Tabla 10. Variabilidad Intradía de los puntos de control de calidad (bajo, medio y alto)

Conc. Nominal µg/mL	Conc. Obs. µg /mL	DER (%)	Desviación (%) Conc. Real	Exactitud (%)
25	23.89	6.6	-4.44	95.56
50	44.34	6.3	-11.32	88.68
150	146	3.0	-2.66	97.33

Tabla 11. Variabilidad interdía de los puntos de control de calidad (bajo, medio y alto)

Conc. Nominal µg/mL	Conc. Obs. µg /mL	DER (%)	Desviación (%) Conc. Real	Exactitud (%)
25	26.02	14.24	4.1	104.1
50	46.95	7.7	-6.1	93.9
150	139.16	4.5	-7.23	92.77

Los parámetros de validación de exactitud y precisión cumplen con los criterios establecidos; en donde el % de exactitud no es estadísticamente diferente al 100% y la precisión es menor a 15 % en todos los puntos ensayados. En consecuencia el método puede ser considerado Exacto y Preciso.

8.5. Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación fue de 3.125 µg/ mL.

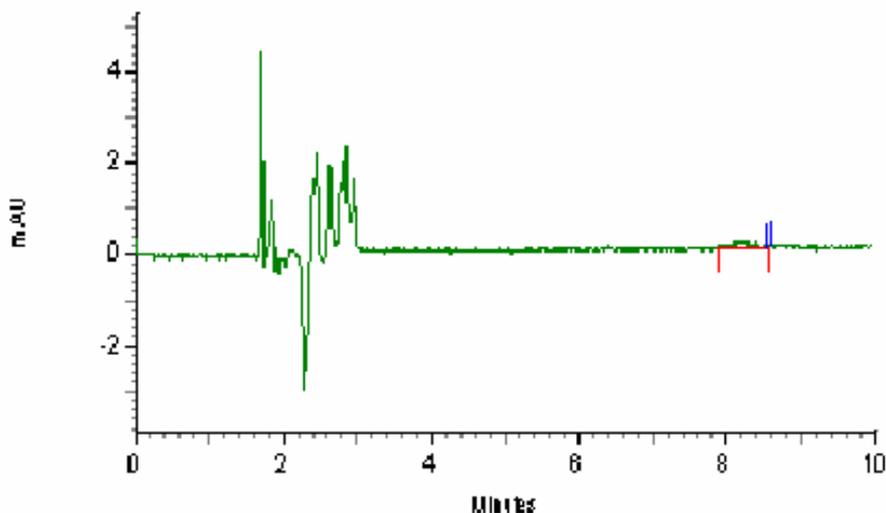


Grafico 7. Límite de cuantificación. Aquí se observa la mínima señal que puede ser integrada por el instrumento.

9. Niveles plasmáticos de la perezona a una dosis de 60 mg/kg IP en rata

Las concentraciones plasmáticas alcanzadas por la perezona en rata a diferentes tiempos se presentan en la tabla 12

Tabla 12. Niveles plasmáticos de la perezona en la rata

Tiempo (min)	X*Conc (µg/ mL)	Desv. estándar
5	0.0	0.0
15	17.56	1.7
30	19.67	0.79
60	21.65	0.76
90	23.78	2.4
120**	26.39	-

*Los resultados se expresan como el valor promedio \pm DE, n = 3 animales

** Valor para un solo sujeto biológico

Tomando en consideración el porcentaje de recobro que es del 22.35%, estamos ciertos que es poco menos de la cuarta parte del contenido de perezona en sangre. Los valores de concentración multiplicados por cuatro punto cinco se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Niveles plasmáticos promedio de perezona en la rata

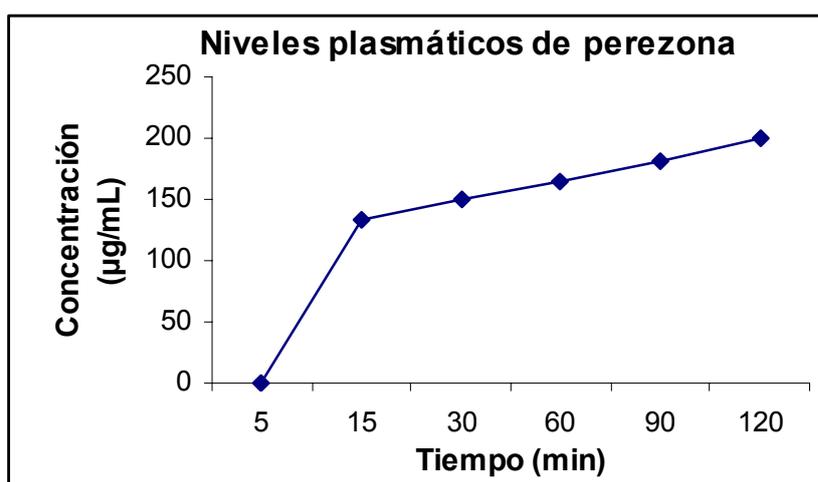
Tiempo (min)	*Conc. promedio ($\mu\text{g}/\text{mL}$) X 4.5
5	0.0
15	79.02
30	88.51
60	97.42
90	107.01
120*	118.75

*valor de un solo sujeto experimental

Al utilizar el porcentaje de recobro o de recuperación de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para la concentración de $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ es de 13.15%, los valores promedio obtenidos para cada tiempo de muestreo se multiplican por 7.6, lo que nos arrojaría los siguientes resultados, presentados en la tabla 14.

Tabla 14. Niveles plasmáticos promedio de perezona en la rata

Tiempo (min)	*Conc. promedio ($\mu\text{g}/\text{mL}$) X 7.6
5	0.0
15	133.45
30	149.50
60	164.54
90	180.73
120*	200.56

**Gráfica 8.** Niveles plasmáticos de perezona en rata

VII. DISCUSIÓN

Para el desarrollo de nuevos fármacos, es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el compuesto a partir de tejidos y fluidos biológicos, e inclusive de formulaciones medicamentosas. Con el fin de asegurar la confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. En este trabajo de desarrollo y validó un método para cuantificar niveles plasmáticos de perezona.

El trabajo experimental se inició con la disolución de la perezona. De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 4, se encontró una alta solubilidad en disolventes orgánicos. La mayor concentración se encontró con el dimetilsulfóxido (DMSO); sin embargo, es un solvente que resulta tóxico para la especie animal, aún en cantidades pequeñas. Se intentó diluir con agua una solución de perezona/DMSO para contrarrestar dichos efectos tóxicos pero la perezona se precipitó. Se pudo constatar la influencia del pH en la solubilidad de perezona cuando ésta se disolvió en los sistemas amortiguadores de fosfatos; a pH de 6, se encontró poca solubilidad, incrementándose ésta, conforme aumentaba el valor de pH, hasta un valor de 9. Un fenómeno parecido se observó con la disolución de perezona en tween 80 ya que también aumenta la solubilización de perezona con el incremento de la concentración del surfactante. Finalmente se optó por utilizar etanol para disolver la perezona, por ser el disolvente en el que había buena solubilidad del compuesto y que además resultaba inocuo para el analista y el sistema biológico. Para administrar la perezona se utilizó aceite de maíz como vehículo, tal como en los estudios de letalidad (Alcántara, 1981) donde tal aceite no presenta efectos tóxicos en el animal en los volúmenes administrados por vía Intraperitoneal.

Con el fin de conocer la λ_{\max} de perezona disuelta en los sistemas amortiguadores tanto de fosfatos como de boratos a diferentes valores de pH, se realizó un barrido espectrofotométrico (Spectronic 20 Genesys). A valores de $\text{pH} > 7.0$ la λ_{\max} no es sensible a los cambios de pH ya que sigue

predominando la especie ionizada y en consecuencia se mantiene en un valor de 530 nm. En los disolventes orgánicos como el hexano, cloroformo y etanol se encontró una λ_{\max} de 400 nm, correspondiente al color amarillo ámbar para la solución ya que la perezona se encuentra en forma neutra. La extracción de la perezona en sangre de rata, se realizó en una micromuestra de sangre total (100 μ L), mediante un proceso de extracción líquido-líquido empleando acetato de etilo, procedimiento que resulta rápido y sencillo.

El porcentaje de recobro o de recuperación, se calculó de dos formas. Una de ellas se realizó graficando la respuesta del detector a diferentes concentraciones del compuesto disueltas en etanol y extraídas con acetato de etilo, en áreas de pico contra la respuesta del detector a las diferentes concentraciones de perezona adicionada a sangre de rata y extraídas bajo el mismo procedimiento, en el cual el valor de la pendiente multiplicada por 100, indica el valor del porcentaje de recuperación. De esta manera, se obtiene un sólo porcentaje de recobro para todos los puntos de la curva de calibración ensayados y que representa un valor promedio.

Por otra parte se realizó el cálculo de acuerdo a la normatividad mexicana, en la cual el cálculo se basa en dividir la respuesta del detector para cada punto de la curva de calibración de perezona en etanol entre la respuesta del detector a la curva de calibración de perezona adicionada a muestras de sangre y esto se multiplica por 100, de manera tal que existe un porcentaje de recobro para cada uno de los puntos de calibración. Esta forma favorece el cálculo de las concentraciones plasmáticas dependiendo de los niveles de concentración detectados en el sistema biológico, como se muestra en la tabla 6. El porcentaje de recobro promedio aquí obtenido fue del 22.35%. Cuando el cálculo se realiza de acuerdo a lo establecido en la norma para la concentración de 20 μ g/mL es de 13.15%. La mayoría de las referencias que hacen mención del porcentaje de recuperación, o de recobro, son de moléculas medianamente hidrosolubles a muy hidrosolubles, por lo que obtienen porcentajes mayores al 90% (Nelis, y col., 1992; Homma, y col., 1999). Las referencias relacionadas con moléculas liposolubles sólo mencionan concentraciones obtenidas sin mencionar el porcentaje de recuperación (Gonçalves da Cruz Fonseca y col., 2003; Sheng hun M. y col.,

2007). Es así que el porcentaje de recobro aquí obtenido resulta adecuado para los fines del estudio.

La linealidad del sistema se validó de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2004, en la que se recomienda el empleo de 3 a 5 puntos experimentales, mientras que para la aplicación en la determinación del analito recomienda de 5 a 7 puntos experimentales. Para construir la curva de calibración sobre la que se calculó la linealidad, siguiendo el método de mínimos cuadrados, se promediaron los valores obtenidos para cinco curvas de cada concentración. En todos los casos, la DER, fue menor a 15%, tal como lo especifica la Norma Oficial Mexicana.

La USP XXII marca que para considerar que el sistema sea lineal se debe obtener un coeficiente de correlación (r) mayor de 0.999, en este caso se obtuvo un valor de 0.9991. La NOM-177-SSA1-2004, especifica un valor para $r = 0.99$, por lo tanto se considera que el sistema es lineal. Otros autores como Pennick y col.. (2003) consideraron linealidad al obtener una $R^2 = 0.996$, cuando en este trabajo se obtuvo un valor todavía mayor ($R^2 = 0.998$).

Por otro lado, se aplicó una prueba de t para pendiente con la finalidad de establecer que la respuesta de la pendiente se debe al experimento que se está realizando. Entonces:

$$H_0: m = 0$$

$$H_1: m \neq 0$$

Para un nivel de significancia del 95% con 4 g.l., el valor de $t_c = 0.48$ t el valor de $t_t = 2.015$. Como $t_c < t_t$, por lo tanto se descarta H_0 y se acepta H_1 , lo cual quiere decir que el valor de la pendiente se debe al cambio de respuesta como consecuencia del cambio del incremento de concentración de perezona.

La precisión es un parámetro de validación que tanto la Farmacopea Británica como la USP incluyen a la repetibilidad y la reproducibilidad. El parámetro estadístico que lo caracteriza es la DER o el coeficiente de variación CV, aunque este término ya está en desuso. La normatividad mexicana acepta una $DER < 15\%$ y permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que corresponde a la dispersión de los datos alrededor de la media. La repetibilidad se valúa a través de la DER y la NOM

específica que esta debe ser menor del 15% para estudios de bioequivalencia; es decir, para estudios en fluidos biológicos. En este caso, los valores obtenidos son menores a este 15% por lo que se considera que hay repetibilidad.

La reproducibilidad también se evalúa con la DER, pero en este caso se acepta que el valor sea igual al obtenido para la repetibilidad o bien un poco mayor ya que en este caso hay un mayor manipuleo de las muestras, lo que significa una mayor fuente de error. Los valores aquí obtenidos son mayores que la repetibilidad pero menores al 15%, por lo que se considera que si existe reproducibilidad en el método.

La exactitud que se define como la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero y refleja el error sistemático o la tendencia a él. En la exactitud se comparan los valores (concentraciones) adicionadas contra las determinadas, de esta manera se puede determinar si los valores observados se parecen a los reales. Las normas que establecen tanto la USP como la NOM-177SSA1-2004, indican que los valores determinados deben ser estadísticamente iguales al 100% (cantidad/concentración adicionada). Aplicando la prueba de t para muestras pareadas donde:

H_0 : valor observado = valor nominal

H_1 : valor observado \neq valor nominal

Para un 95% con 2 g.l., el valor de $t_c = 1.73$ y el valor de $t_t = 2.92$. Luego entonces $t_c < t_t$. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula, por lo que los valores obtenidos no son estadísticamente diferentes de los valores nominales, por lo tanto el método es exacto.

Algunos autores (Castillo B. y González R., 1996) diferencian a la selectividad de la especificidad. Considerando la selectividad como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y a la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto. Siguiendo estas definiciones se puede observar en la Gráfica 5 B que no existen interferencias de los componentes endógenos de la matriz en la determinación de la

perezona. El pico de la perezona aparece sin ningún otro pico aledaño, por lo que se trata de un método selectivo.

El límite de detección se puede observar en el cromatograma de la gráfica 7, y es la concentración de 3.125 µg/mL.

En este trabajo se utilizaron ratas Wistar machos adultos, a los que se les administró una dosis de 60 mg/kg de peso corporal de la sustancia de prueba disuelta en aceite de maíz por vía intraperitoneal. Esta especie animal en particular, tienen un volumen sanguíneo de 57.5 – 69.9 mL/kg de peso corporal (Sharp P. E. and La Regina M.C., 1998). Si la molécula se distribuyera únicamente en el compartimiento central (sangre), tendría niveles de concentración de aproximadamente 1mg/mL de sangre.

Con este método de acuerdo a la normatividad mexicana estamos detectando niveles plasmáticos de perezona a los 15 minutos de 133.45 µg/mL, lo que nos permite inferir que ocurre una absorción lenta o bien una absorción muy pobre como ocurre con otros compuestos liposolubles como es el caso de los benzimidazoles (Bennett, 2003).

Después de la muerte del animal se le realizó una laparotomía amplia, con lo cual, se podía observar dentro de la cavidad peritoneal la presencia del compuesto en su base aceitosa (vehículo). Además, la perezona que es un compuesto liposoluble por lo que tiene una alta afinidad por la grasa corporal. Los animales empleados en el estudio tenían pesos de 400-450g y con ello la acumulación de grasa abdominal podría ser un factor determinante para que se depositará en este tejido.

Pudiera también suceder una alta distribución y/o metabolismo, esto debido a las características lipófilas que facilitan su paso a través de las membranas biológicas (Wilkinson, 2003). Puede además estar unida a las proteínas plasmáticas dado que compuestos ácidos se unen a la albúmina plasmática y la perezona en un compuesto con esa característica. Pasados 90 minutos después de la administración de la sustancia se encontraron niveles de 180.73 µg/mL. De tal manera que después de transcurridos 75 minutos sólo se detecta un incremento de aproximadamente 67.11 µg/mL. Se realizó un estudio preliminar de determinación de perezona en diversos tejidos de la

rata, la presencia de la perezona se detectó en homogenados de hígado, cerebro y una pequeña cantidad en intestino. No se observó su presencia en riñón y corazón. Todo esto se realizó empleando cromatografía en capa fina (hexano/acetato de etilo 9:1)

Cabe hacer mención que la dosis administrada esta comprendida en el intervalo tóxico de la perezona, por esa vía de administración (Alcántara, 1981), razón por la cual mueren los animales en el transcurso de 2 horas, así que no fue posible obtener datos de otros tiempos mayores con una $n = 3$. Los animales "control" administrados únicamente con el vehiculo (aceite de maíz) sobreviven al experimento.

Dado que los niveles plasmáticos de la perezona en rata son bajos en relación a la dosis administrada, se entiende que su distribución y afinidad por otros tejidos es muy amplia, además de su conocida liposolubilidad (Joseph-Nathan P. 1974, 2006). Cuando los animales fallecían a consecuencia de la dosis administrada se extrajo el cerebro completo y se realizó el proceso de extracción con una variante en la que después de triturar el tejido se le adicionó solución salina isotónica, se acidificó con ácido acético 1M, a un pH de 4.5 para posteriormente seguir el mismo proceso que para el tejido hemático. La perezona se cuantificó en el sistema cromatográfico obteniendo los siguientes valores individuales de concentración: a los 90 minutos después de la administración se encontraron $50.89\mu\text{g/mL}$ y a los 120 minutos $198.75\mu\text{g/mL}$ por cada gramo de tejido cerebral. Los niveles cerebrales de perezona para 120 minutos son muy similares que los encontrados para ese tiempo a nivel plasmático, lo que viene a reforzar la suposición de que la sustancia se distribuye ampliamente en diversos tejidos, principalmente en los de mayor contenido lipídico.

A manera de comparación se buscaron diferentes métodos de determinación de quinonas, ya que no existen para perezona. Se han reportado algunos métodos de cuantificación de niveles plasmáticos en otras benzoquinonas tales como la idebenona [(6)10-hidroxidecil)-2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona]] (Tabla No. 2). Esta es una quinona usada en el tratamiento de desordenes neurológicos severos: ataxia de Friedreich (Rustin y col., 1999a, b; Schöls y col., 2001), encefalomiopatias mitocondriales (Pisano y col., 1996;

Napolitano y col., 2000) y demencia senil (Wakabayashi y col., 1992), alcanza su C_{max} (316 ± 85) $\mu\text{g/L}$ a un T_{max} de (96 ± 30) minutos después de una dosis de 30 mg administrada por vía oral (Hu Pei, 2000 y Artuch, 2002); en este estudio son aproximadamente los tiempos en que se realizaron las mediciones. Los tiempos a los que encuentran la C_{max} son parecidos a los tiempos de muestreo realizados en el presente estudio. De acuerdo a los resultados obtenidos y los resultados reportados para otras quinonas, tales como la idebenona, existen evidencias de que la perezona y moléculas relacionadas son capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica.

De los trabajos descritos en la literatura en relación a la actividad biológica de la perezona tanto en estudios "*in vivo*" como "*in Vitro*", las dosis utilizadas en dichos estudios como lo son en el concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de una suspensión de perezona en tris-tween 80 5% v/v (Enríquez y col., 1980), o bien el estudio realizado en ileon aislado de rata (García y col., 1995) con concentraciones de 4×10^{-4} M (99.92 $\mu\text{g/mL}$), 4×10^{-5} M (9.92 $\mu\text{g/mL}$), concentraciones que pueden ser cuantificados por el método propuesto en el presente estudio. Otros niveles de concentración mayores como los utilizados en por Ferrusquía y col. 1991, son también cuantificables. Con lo anteriormente presentado el método desarrollado y validado en el presente trabajo, es un método sencillo y rápido, aplicable para la cuantificación tanto de niveles plasmáticos como de distribución de la perezona en los diferentes fluidos y tejidos de la rata o de otra pequeña especie de roedores.

VIII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolla y valida un método por HPLC para determinar perezona en sangre de rata, método que cumple con los parámetros de validación tal y como se especifica en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-2004

El método de este trabajo es un método sencillo, específico, lineal, preciso y exacto por lo que puede ser utilizado en estudios farmacocinéticos.

El método se aplicó en la determinación de niveles plasmáticos de perezona en sangre, encontrándose niveles bajos del compuesto aún cuando la dosis administrada se encuentra dentro del rango tóxico para el compuesto y vía de administración empleada.

El método se puede aplicar en estudios farmaco-toxicológicos

La evidencia experimental nos permite inferir una absorción pobre y lenta del compuesto, con una amplia distribución en tejidos con alto contenido de grasa, además de ser capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica.

IX. PERSPECTIVAS

Con estos datos preliminares, es posible observar que la perezona es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica e inferimos también una amplia distribución en otros tejidos por lo que se deberá continuar con los experimentos y así determinar el % de distribución en cada uno de ellos.

Se puede realizar la extracción de perezona de muestras sanguíneas y de otros tejidos por medio de extracción en fase sólida.

Realizar la cuantificación de los niveles plasmáticos por medio de otras vías de administración, por ejemplo vía oral.

Disminuir la dosis por vía IP, para disminuir la toxicidad y con ello lograr tiempos mayores de muestreo.

Realizar la disolución de perezona de manera que ésta pueda ser administrada por vía intravenosa.

Probar la vía intravenosa para la cuantificación de los niveles plasmáticos de perezona.

Caracterizar los parámetros farmacocinéticos de la molécula.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Martínez, M., Bautista-Martínez, J. A., Macias-Ruvalcaba, N., González, I. Tovar, E., Marín del Alizal, T., Collera, O., Cuevas, G. 2001. Molecular Structure of Substituted Phenylamine α -OMe- and α -OH-*p*-Benzoquinone Derivatives. Synthesis and Correlation of Spectroscopic, Electrochemical, and Theoretical Parameters. *J. Org. Chem.* 66 (25), 8349-8363.
- Alcántara, G., García Yañez, E., Mendoza, V., Nateras, B., Sánchez, A., Campos, AE., García, J., 1981. Acute toxicity of perezona and some analogues. *8th. International Congress of Pharmacology*, Tokio, p. 359.
- Altamirano, F. 1905. La raíz del pipitzahoac (*Perezia adnata?*) Estudios histoquímicos, en *Anales del Instituto Médico Nacional*, Tomo VII. México. p. 18.
- Anuario 1, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. 1986 Morelia. Michoacán p.1.
-
- Artuch R., Colome C., Vilaseca Ma. A., Asun A., Pineda M. 2002. Monitoring of idebenone treatment in patients with Friederich's ataxia by High-pressure liquid Chromathography with electrochemical detection. *J. Neuroscience Meth.* 115: 63-66.
- Bautista-Martínez, J. A., González, I., Aguilar-Martínez, M. 2004. Correlation of voltammetric behavior of α -hydroxy and α -methoxy quinones with the change of acidity level in acetonitrile. *J. Electroanal. Chem.*, 573(2), 289-298.

- Baytelman, B. 1993. Acerca de plantas y de curanderos. INAH, México, pp 33-36.
- British Pharmacopeia Commission. 1988. British Pharmacopeia. London: Her Majesty's Stationery Office. 2.
- Burgueño-Tapia, E., Joseph-Nathan, P. 2000. ^{13}C NMR substituent chemical shifts in hydroxy-p-benzoquinones. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 38(5), 390-393.
- Cárabez, A., Sandoval, Z. F. 1988. The action of the sesquiterpenic benzoquinone, perezona, on electron transport in biological membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 260(1), 293-300.
- Castillo, B. y González, R., 1996. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev. Cubana Farm.*, 30 (1) [citado 06 Febrero 2007], p.0-0. Disponible en la World Wide Web:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&nrm=iso.ISSN0034-7515.
- Chávez Edmundo. 2004. El estrés oxidativo en miocardio. Una visión experimental. *Arch. Cardiol. Mex.* 74(2), S271-S274.
- Cuéllar, A., Carábez, A., Chávez, E. 1987. Calcium releasing effect of perezona on adrenal cortex mitochondria. *Life Sci.* 41(17), 2047-54.
- De la peña, A., Izaguirre, R., Banos, G., Viveros, M., Enríquez, R. G. Fernández-G, J. M. 2001. Effect of perezona, aminoperezona and their corresponding isomers isoperezona and isoaminoperezona upon *in vitro* platelet aggregation. *Phytomedicine: Internat. J. phytother. phytopharmacol.* 8(6), 465-468.
- De Pahn, E. M., Molina Portela, M. P., Stoppani, A. O. 1988. Effect of quinones and nitrofurans on *Trypanosoma mega* and *Crithidia*

fasciculata. *Rev. Arg. microbiol.* 20(3), 107-18.

- Enríquez, R., Ortega, J., Lozoya, X. 1980. Active components in perezia roots. *J. Ethnopharmacol*, 2(4), 389-393.
- Fan Z., Wang Y.Q., Zhang X.H., et al., 1999. Determination of Idebenone in human plasma by HPLC. *J. Chinese Pharm.* 34(6)
- Frontana, C., Frontana-Urbe, B. A., González, I. 2004. Electrochemical and ESR study on the transformation processes of α -hydroxy-quinones. *J. Electroanal. Chem.*, 573(2), 307-314.
- García, X., Alcántara-Sarabia, G., Cartas-Heredia, L., Gijón, E. 1995. Action of perezone on rat smooth muscle. *Gen. Pharmac.* (26)8, 1741-1745.
- García, X., Cano, L., Herrera, L., Magaña, N. R., Alcántara, G., Gijón, E. 1992. Perezone relaxing vascular action. *Proc. West. Pharmacol. Soc*, 35: 93-96.
- Gómez-Pompa, A. 1993. Las raíces de la etnobotánica mexicana. En: S. Guevara, P. Moreno-Casasola & J. Rzedowski (compiladores). *Logros y Perspectivas del Conocimiento de los Recursos Vegetales de México en vísperas del Siglo XXI*. Instituto de Ecología A, C. y Sociedad Botánica de México, pp. 26-37.
- Gonçalves da Cruz Fonseca, S., Carvalho, R. and Pereira de Santana, D. 2003. Lapachol-chemistry, pharmacology and assay methods. *Rev. Bras. Farm.* 84(1) 9-16.
- Guevara, U., Campos, E., Gómez, J., Valenzuela, A. Fuentes Ramón, De Lille, Martínez, Ma. E. (2004) Transcutaneous electrical nerve stimulation prevents visceral pain in mice, *Can. J. Anesth*, 51(4), 400.

- Guo, Xin Dong, Huang, Zhi Shu, Bao, Ya Dan, An, Lin Kun, Ma, Lin, Gu, Lian Quan. 2005. Two new sesquiterpenoids from *Helicteres angustifolia* *Chinese Chem. Lett.*, 16(1), 49-52.
- Harris, D. C. 2001. "Análisis Químico Cuantitativo", Editorial Reverté S.A., 2ª edición, España, pp. 626-636.
- Homma, M., Jayewardene, A. L., Gambertoglio, J. and Aweeka, F., 1999. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Rivarin in Whole Blood to Assess Disposition in Erythrocytes. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 43(11) 2716-2719.
- Hu P., Jiang J., Xie H.H. 2000. Determination of Idebenone in human plasma by HPLC/MS. *Acta Pharmacol. Sin.* 21: 308-308.
- Huipe-Nava, E., Mendoza, V., García, E., Guzmán, J. A., Salvador, J. L., Soriano-García, M. 2000. Structure of β -isopipitzol (4,8,8,10-tetramethyl-9-hydroxy-2,12-dioxotricyclo[5,3,1,03,7]undec-1-en). *Anal. Sci.* 16(11), 1239-1240.
- Joseph-Nathan P. 2006. The Chemistry of Perezone from 1852 to the 21th century. Abstracts. UANL International Symposium on Natural Products. Monterrey, México.
- Joseph-Nathan, P. 1974. Chemistry of perezone as a tribute to Doctor Leopoldo Rio de la Loza on the centennial anniversary of his death. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 18(5), 226-41.
- Joseph-Nathan, P., Reyes, J., González, Ma. P. 1968. Contribution to the chemistry of perezone. *Tetrahedron* 24(10), 4007-13.
- Martínez, Maximino 1969. Las Plantas Medicinales de México, Editorial Botas, México, p.158.

- Mathews, C. K. y Van Holde, K. E. 1998. Bioquímica, 2ª edición, McGraw-Hill Interamericana, España, Cap. 15, pp. 574-593.
- Molina Portela, M P; de Pahn, E M; Galeffi, C; Stoppani, A O. 1991. Effect of lipophilic ortho-naphthoquinones on the growth of and production of peroxides by *Leptomonas seymouri* and *Crithidia fasciculata*. *Rev. Arg. Microbiol.* 23(1)1-14.
- Nelis, H. J., Vandenbranden, J., De Kuif, A. and De Leenheer, A. 1992. Liquid Chromatographic Determination of Amoxicillin Concentrations in Bovine plasma by Using a tandem Solid-Phase Extraction Method. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 36(9) 1859-1863.
- Pennick, G. J., Clark, M., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G. 2003. Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Assay for Voriconazole. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 47(7) 2348-2350.
- Perrusquía, M., Ibáñez, R. y Alcántara, G. 1991. Relaxant effect of perezona on contraction of isolated rat uterus. *Med. Sci. Res.* 19(24) 857-858.
- Pisano P, Durand A, Autret E, Desnuelle C, Pinsard N, Serratrice G, et al. 1996. Plasma concentrations and pharmacokinetics of idebenone and its metabolites following single and repeated doses in young patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Eur J Clin Pharmacol*, 51:167-9.
- Quattrocchi, O. A., et al. 1992. "Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica", Artes gráficas Farro, S.A. Buenos Aires, Argentina, 319 p.
- Ramírez, J. 1894. Datos para la materia médica mexicana, Secretaria de Fomento, *Anal. Inst. Méd. Nac.* Tomo I, México, pp. 18-23, 63-78.

- Rubinson, K. A. y Rubinson J. F. 2001. "Contemporary Instrumental Analysis", Prentice-Hall, USA, pp. 584 – 652.
- Rustin P, Munnich A, Rötig A. 1999 Quinone analogs prevent enzymes targeted in Friedreich ataxia from iron-induced injury in vitro. *Biofactors*; 9:247 - 51.
- Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A, Rötig A. 1999. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet*. 354: 477- 9.
- Rzedowski J. 1981. Un siglo de botánica en México. En: Las plantas medicinales en México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 40 :1-14.
- Sánchez, I. H., Mendoza, S., Calderón, M., Larraza, Ma. I., Flores, H. J. 1985. Total synthesis of (+/-)-perezona. *J. Org. Chem.* 50(25), 5077-9.
- Scobbie E. and Groves J. A. 1999. Determination of Hydroquinone in Air by High Performance Liquid Chromatography. *Ann. Occup. Hyg.* 43(2):131-141.
- Sharp P. E. and La Regina M.C. 1998. The Laboratory Rat. A volume in the laboratory animal pocket reference series, CRC Press LLC. USA, p. 11.
- Sheng Jun, M., Jin, H. YueQi, B., Zhen, L., Hui L. and ShiXiang, H., 2007. Ion-pair Reversed-Phase HPLC Method for Determination of Sodium Tanshinone IIA Sulfonate in Biological Samples and Its Pharmacokinetics and Biodistribution in Mice. *Chem. Pharm. Bull.* 55(5)753-756.
- Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T.A. 2001 "Principios de Análisis Instrumental" 5ª edición, Mc Graw Hill/ Interamericana, Madrid España, pp. 730 – 754.

- So Hee Kim, Young Jin Moon, Chung-Kyu Ryu, Myung Gull Lee. 2002. Determination of a new isoquinolinedione derivative, 7-anilino-5,8-isoquinilidione, in plasma, urine and tissue homogenates by high-performance liquid chromatography. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 30:519-526.
- Téllez, J. F., Carbajal, K., Cruz, D., Cárabez, A., Chávez, E. 1999. Effect of perezona on arrhythmias and markers of cell injury during reperfusion in the anesthetized rat. *Life Sci*. 65(16), 1615-1623.
- Turunen M., Appelkvist E-L., Sindelar P., Dallner G. 1999. Blood Concentration of Coenzyme Q₁₀ Increases in Rats When Esterified Forms Are Administered *J. Nutr*. 129: 2113–2118.
- United States Pharmacopeial Convention USP XXII: United States Pharmacopoeia. 1990. 22ed. Easton: Mack Printing, 466, 1086, 1682.
- Vidrio, H. y Alcántara G. 1992. Cardiovascular effects of perezona in the anesthetized rat. *Rev. Fac. Med. UNAM*, 35(3)104-107.
- Wakabayashi H, Nakajima M, Yamato S, Shimada K. 1992. Determination of idebenone in rat serum and brain by high-performance liquid chromatography using platinum catalyst reduction and electrochemical detection. *J Chromatogr*. 573:154 -7.
- Walls F., Salmón, N., Padilla, J., Joseph-Nathan, P., y Romo, J. 1965. La estructura de la perezona, *Bol. Inst. Quím. U.N.A.M.* 17, 1-15.
- Wayne Moss C., Guerrant G. O., 1983. Separation of Bacterial Ubiquinones by Reverse-Phase High Pressure Liquid Chromatography. *J. Clin. Microbiol*. 18 (1): 15-17.
- Wilkinson Grant R. 2003. Farmacocinética. Dinámicas de absorción, distribución y eliminación de fármacos en: Goodman y Gilman Las

Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10ª edición, McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 5-33.

ANEXO 1

Preparación de soluciones

Tabla 15. Muestra la manera en que se prepararon las diferentes concentraciones de la Curva de calibración a partir de una solución “stock”, con una concentración de 200 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	Solución 200 µg/mL (µL)	Etanol absoluto (µL)	Volumen final (µL)
200	1000	0	1000
100	500	500	1000
80	400	600	1000
60	300	700	1000
40	200	800	1000
20	100	900	1000

Tabla 16. Muestra la preparación de las concentraciones de los puntos de control a partir de la solución stock de 200 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	Solución 200 µg/mL (µL)	Etanol absoluto (µL)	Volumen final (µL)
150	750	250	1000
50	250	750	1000
25	125	875	1000