



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

**EVALUACION PREELIMINAR DEL FENOTIPO ACETILADOR DE
SULFAMETAZINA Y ACETILSULFAMETAZINA EN ORINA, EMPLEANDO UN
METODO POR HPLC.**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN
FARMACIA

PRESENTA: CITLALI DEL CARMEN ELIOSA NAVARRO

DIRECTOR DE TESIS:

M.C. BENJAMIN SANDOVAL GUZMÁN

PUEBLA, PUE.

JUNIO 2015

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	5
I.I Farmacogenética.....	5
I.II Farmacogenética de la acetilación.....	5
I.III Importancia clínica del polimorfismo acetilador	12
I.IV Sulfametazina.....	14
I.IV.I Efectos secundarios de la sulfametazina	15
I.IV.II Uso de la sulfametazina en estudios de fenotipo acetilador	15
I.V. Introducción a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	17
I.V.I Cromatografía de fase reversa	17
I.VI. Conceptos básicos	19
I.VI.I. Tiempo de retención (T_R).....	19
I.VI.II. Tiempo muerto (T_M)	19
I.VI.III. Factor de capacidad (k)	19
I.VI.IV. Factor de separación (α)	20
I.VI.V. Platos teóricos.....	21
I.VI.VI. Resolución (R_s).....	22
I.VI.VII. Asimetría (A_s).....	23
I.VI.VIII. Factor de coileo (T_f)	23
I.VII. Validación	24
I.VII.I Linealidad	25
I.VII.II Selectividad.....	25
I.VII.III Precisión	26
I.VII.IV Repetibilidad.....	26
I.VII.V Reproducibilidad.....	27
I.VII.VI Límite de detección	27
I.VII.VI Límite de cuantificación	28
I.VII.VII Robustez.....	28
I.VII.VII Método de calibración con estándar interno.....	28
II. HIPÓTESIS	30
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. OBJETIVO	31

Objetivos particulares	31
V. METODOLOGÍA	32
V.I Validación del método analítico	32
V.I.I Condiciones de separación de las muestras.....	33
V.II.II Elección del estándar interno	37
V.III Criterios de inclusión y exclusión de voluntarios	38
V.IV Inicio de la validación del método analítico para cuantificar sulfametazina y acetilsulfametazina en orina humana.....	39
V.IV.I Linealidad del método	41
V.IV.II Precisión	42
V.IV.III Selectividad del método.....	42
V.IV.IV Repetibilidad.....	42
V.IV.V Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)	42
V.IV.VI Robustez.....	43
V.IV.VII Estabilidad de las muestras	43
V.V Prueba del método analítico en muestras de voluntarios sanos	44
V.V.I Instrucciones de toma del fármaco y recolección de muestras	44
V.V.II Análisis de las muestras	44
V.V.III Determinación del fenotipo acetilador	45
VI. RESULTADOS	48
VI.I Resultados de la validación del método analítico	48
V.I. I Linealidad del método	48
VI.I.II Selectividad del método	52
VI.I.III Límite de cuantificación y límite de detección.....	53
VI.I.IV Precisión	53
VI.I.V Repetibilidad	54
VI.I.V Robustez	54
VI.I.VI Estabilidad de las muestras	56
VI.II Resultados obtenidos para análisis de muestras de voluntarios	56
VII.DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
Desarrollo y validación del método analítico.....	60
Fenotipo acetilador	61
VIII.CONCLUSIÓN	63

IX. BIBLIOGRAFÍA	64
X. ANEXOS	68
Anexo I.- Acta de Consentimiento	68
Anexo II.- Ejemplos de Actas de Consentimiento Firmadas	70
Anexo III.- Tabla de los resultados obtenidos al analizar las muestras de voluntarios sanos.....	74
Anexo IV. Material ocupado para la cuantificación del sulfametazina y acetilsulfametazina en orina humana	77

I. INTRODUCCIÓN

I.I Farmacogenética

La farmacogenética es una disciplina orientada al estudio de las bases genéticas de las diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos, tanto a nivel de eficacia como de seguridad. Tiene como principal objetivo el desarrollo de la medicina individualizada, para poder optimizar la eficacia de los fármacos, limitar la toxicidad de los mismos, reducir los costes, y por tanto mejorar la calidad asistencial.^[1]

I.II Farmacogenética de la acetilación

La biotransformación de xenobióticos es el principal mecanismo para mantener la homeostasis durante la exposición del organismo a moléculas extrañas como fármacos. En general, la biotransformación de xenobióticos, se lleva a cabo por algunas enzimas con una amplia especificidad de sustratos. Las reacciones catalizadas por enzimas involucradas en el metabolismo, generalmente se dividen en dos grupos llamados de fase I y de fase II. Las reacciones de fase I incluyen hidrólisis, reducción y oxidación. Estas reacciones se caracterizan por introducir un grupo funcional y generalmente dan por resultado un pequeño incremento en la hidrofiliidad. Las reacciones de fase II incluyen la glucuronidación, sulfonación, acetilación, metilación, conjugación con glutatión, y conjugación con aminoácidos. La mayoría de las reacciones de fase II tiene por resultado un gran incremento en la hidrofiliidad del xenobiótico, por lo cual se promueve la excreción de éstos. La fase II de la biotransformación, no necesariamente es precedida por las reacciones de fase I.

Entre las enzimas de fase I se encuentra la familia de citocromos P-450, flavin monooxigenasas, epóxido hidrolasa, esterasas, amidasas y otras enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación. Dentro de las enzimas de fase II están la UDP-glucuronil-transferasas, sulfotransferasas, metiltransferasas, glutatión S-transferasas, diferentes tipos de acil-CoA: A-

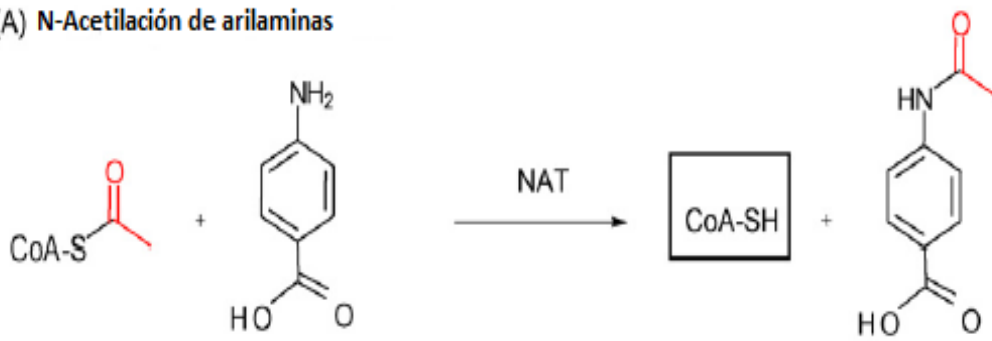
aciltransferasas de aminoácidos y finalmente arilamin N-acetiltransferasas (NAT). [2]

Algunos fármacos relevantes para la terapéutica en humanos son biotransformados por acetilación principalmente para su excreción. La habilidad para efectuar el proceso de acetilación en general y en particular a los fármacos esta genéticamente determinado y es de naturaleza polimórfica, los individuos de una misma población, pueden clasificarse como acetiladores rápidos o deficientes por su habilidad para convertir algunas aminas e hidracinas a su derivado acetilado. Las bases genéticas de la capacidad del polimorfismo acetilador reside en la existencia de dos alelos mayoritarios en un locus único de gen autosómico que gobierna la producción de N-acetil transferasa, una enzima hepática no microsomal. [3]

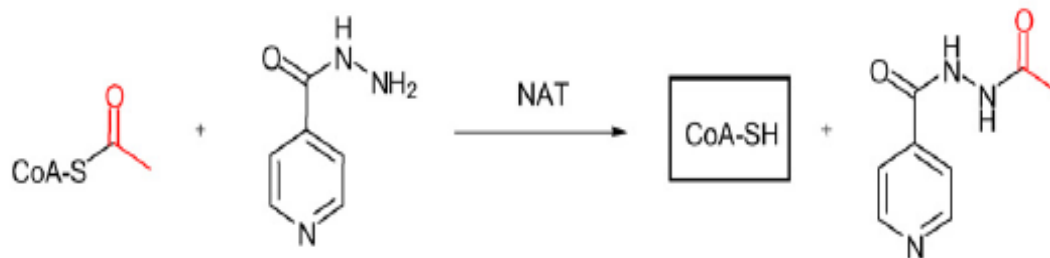
La reacción de acetilación es llevada a cabo cuando la N-acetil transferasa cataliza la transferencia de un grupo acetyl proveniente de la Acetil CoA a un nitrógeno del sustrato. [4] **(Figura 1)**

Se ha demostrado que existen 3 genes distintos que codifican a las N-acetiltransferasas en humanos: NAT1, NAT2, en la cual recae el presente trabajo, y NATP, el cual es un pseudogen que contiene mutaciones que impiden a su ácido ribonucleico mensajero (RNAm) traducirse en proteína funcional.[16]

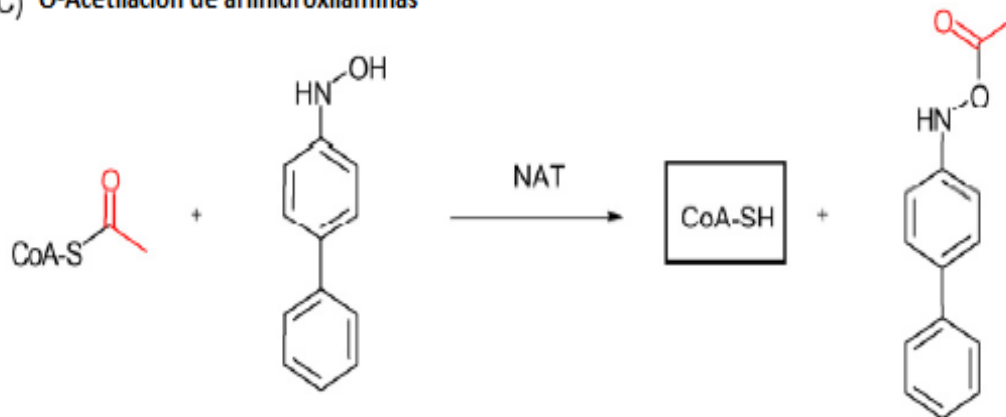
(A) N-Acetilación de arilaminas



(B) N-Acetilación de arilhidrazinas



(C) O-Acetilación de arilhidroxilaminas



(D) N,O acetiltransferencia



Figura 1-. Resumen de los mecanismos de las reacciones catalizadas por arilamin N- acetiltransferasas. Las reacciones (A), (B) y (C) conducen a la hidrólisis de acetilCoA al igual que a la acetilación de la molécula aceptora del grupo acetil. Mientras que (A) y (B) inactivan el sustrato, las reacciones (C) y (D) tienen como consecuencia la activación del sustrato.^[16]

La NAT2 es una enzima de fase II, que se encuentra en el hígado y la mucosa del yeyuno, responsable de la reacción de N-acetilación de xenobióticos, que incluyen aminas aromáticas, sulfonamidas, y aminas alifáticas las cuáles se encuentran presentes en fármacos muy comunes como la cafeína, la isoniazida, el clonazepam, la sulfametazina, entre otras. [7] De igual manera se pueden metabolizar xenobióticos cancerígenos por esta vía metabólica. Entre ellos se encuentran la benzidina, el 2-aminofluoreno y la B-naftilamina. Por lo tanto, la N-acetilación puede modular la actividad farmacológica y detoxificar carcinógenos. [5,7] En la tabla 1, se presentan algunos ejemplos.

Fármacos	Xenobióticos
Aminoglutetimida	Benzidina
Aminopirina	4-aminobifenil
Amirinona	4-aminofenol
Cafeína (metabolitos)	2-aminofluoreno
Clonazepam (metabolitos)	2-naftilamina
Dapsona	
Dipirona	
Fenelzina	
Hidralazina	
Nitrazepam (metabolitos)	
Procaínamida	
Sulfametazina	
Sulfapiridina	

Tabla 1.- Ejemplos de sustratos de acetilación por parte de NAT2

Al administrar algunos fármacos que principalmente son metabolizados por la NAT2 y al evaluar la frecuencia de la capacidad acetiladora, la población en general, presenta un amplio rango de actividad de N-acetilación y el comportamiento ha sido caracterizado por algunos autores como representados por una distribución bimodal y/o trimodal. Esta distribución de la actividad ha dado por resultado que los individuos sean clasificados en general como rápidos

o deficientes (modelo bimodal) o rápidos, intermedios y deficientes (modelo trimodal). La proporción en la capacidad acetiladora varía dependiendo de los grupos étnicos. El fenotipo de acetiladores deficientes es más prevalente en Norte Americanos (90%) y Escandinavos (75-85%), en cambio es menor en Esquimales Canadienses y Japoneses (5%); en poblaciones de China, la proporción de lentos es 40%, y de 40-60% en Afroamericanos. [7,13]. En la tabla 2, se presenta un resumen de diversos grupos étnicos y de su capacidad acetiladora.

Grupo étnico	% de acetiladores deficientes
Blancos-Canadienses	76.0
Blancos-Americanos	90.0
Africanos (Dogons)	75.0
Inuits	5.0
Blancos Europeos	73.7
Africanos (Gabón)	73.0
Afroamericanos	40-60
Filipinos	60.5
Chinos	40.0
Polinesios	40.0
Japoneses	5.0
Coreanos	31.9

Tabla 2.- Diferentes grupos étnicos con su respectivo porcentaje de acetiladores deficientes

En consecuencia, los metabolizadores deficientes tendrán mayor riesgo de presentar efectos adversos producidos por fármacos cuya vía metabólica principal sea la acetilación. A diferencia de los metabolizadores más rápidos, los cuales probablemente no alcancen los niveles terapéuticos adecuados.

Se sabe que la actividad de la N-acetiltransferasa (NAT) está principalmente controlada por la información genética, y que no depende de la edad, ni del sexo [3], La NAT1 y NAT2 son codificadas por 2 genes de 870 pares de bases,

respectivamente. Los genes se encuentran en el cromosoma 8, y ambos se expresan de una manera autosomal codominante. [6] De igual manera ambos tienen una similaridad del 87% en la secuencia de nucleótidos y codifican proteínas de 290 aminoácidos que coinciden en un 81%. [16] El locus de NAT2, tiene alelos que contienen de uno a cuatro polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) [8]. En poblaciones humanas, se han reportado 52 alelos para NAT2.

El polimorfismo acetilador que involucra al NAT2 es causado por mutaciones puntuales responsables de diversos efectos que se manifiestan en el fenotipo [14]. Se sabe que el polimorfismo de NAT2 da por resultado en una variación de la capacidad acetiladora y se ha asociado con la incidencia de algunas enfermedades. Generalmente las mutaciones puntuales en la NAT2 resultan en una baja actividad enzimática, expresión disminuida e inestabilidad de la enzima. Un fenotipo deficiente se observa por lo general en individuos con dos copias de líneas de bases de alelos que contienen cualquiera de las mutaciones puntuales. Un fenotipo rápido está codificado por el alelo silvestre *NAT2*4*[15]. Los acetiladores rápidos generalmente tienen dos alelos silvestres o un alelo silvestre con una variante alélica.[6]. El fenotipo acetilador deficiente es heredado como una característica autosómica recesiva homocigótica, mientras que los acetiladores rápidos son heredados como una característica autosómica dominante heterocigótica u homocigótica. En la figura 2 se hace una representación de su estructura.



Figura 2.- Estructura de la enzima NAT2 humana.

Existen 7 tipos de polimorfismo de un solo nucleótido en el gen humano que codifica para *NAT2*, que consisten en más de 27 alelos diferentes de *NAT2*. Dos de estas variantes son silenciosas y otras cinco causan sustitución de aminoácidos. Se ha encontrado que C341→T para *5, G590→A para *6 y G857→A para *7, las cuáles codifican para otros aminoácidos. Estas sustituciones alteran significativamente la actividad de *NAT2*. A pesar que C481→T y G803→A no causan sustitución de aminoácidos, hay estudios que sugieren que estas mutaciones puntuales pueden afectar la estabilidad y además reducir la cantidad de *NAT2* en el hígado^[2]. Se ha reportado que los alelos *5 (A,B,C, etc.), *6 (A,B), y *7 (A,B) son responsables de codificar para acetiladores lentos ^[2,14].

En algunos estudios mediante una reacción restricción de cadena de polimerasa (PCR) se ha determinado otro tipo de polimorfismo atribuido a *NAT2*, dicho polimorfismo depende de si un individuo es homocigoto o heterocigoto. Así mismo, se han identificado los siguientes alelos múltiples:

*NAT2**4/4, el cuál codifica para acetiladores rápidos; *NAT2**4/*5, *NAT2**4/*6, *NAT2**4/*7, codifican para acetiladores intermedios; finalmente *NAT2**5/*5, *NAT2**5/*6, *NAT2**5/*7, *NAT2**6/*6, *NAT2**6/*7, *NAT2**7/*7, los cuales codifican para acetiladores lentos.^[8]

I.III Importancia clínica del polimorfismo acetilador

La arilamin N-acetiltransferasa (NAT) fue una de las primeras enzimas en la cual se reportaron diferencias en la respuesta a fármacos. El polimorfismo en la acetilación se descubrió tras la introducción de isoniazida para el tratamiento de la tuberculosis^[10]. Se observó que altos niveles plasmáticos de ésta producían neuropatía. En 1955 Hugues y cols, describen que el principal metabolito excretado de la isoniazida es la acetilisoniazida. En 1957 Mitchel y Bell clasifican a un grupo de pacientes en tratamiento con isoniazida como inactivadores deficientes, rápidos e intermedios en función de los resultados obtenidos al medir las concentraciones séricas de fármaco a las 6 horas de ingesta. Evans 1960 indicó que la capacidad metabolizadora dependía de la constitución genética.

Estas observaciones clínicas iniciales fueron seguidas por el descubrimiento de que la distribución en la población de la capacidad acetiladora dependían de la etnia de dicha población.

El polimorfismo del gen *NAT2*, se ha relacionado con la posibilidad de tener mayor riesgo de desarrollar determinadas enfermedades, además de que se pueden sufrir con más facilidad los efectos adversos de fármacos que son metabolizados por acetilación. En el ámbito de las enfermedades, las neoplásicas han recibido más atención. Como ya se mencionó hay determinadas sustancias cancerígenas en forma de aminas aromáticas que son metabolizadas por la *NAT2*, dando por resultado la inactivación de dichas sustancias cancerígenas, lo que nos podría llevar a suponer que los metabolizadores lentos tendrían más posibilidades de desarrollar determinados tipos de cáncer. ^[5], debido a poca capacidad para eliminar dichas sustancias.

El cáncer que parece estar más relacionado con el polimorfismo acetilador de NAT2 es el de vejiga. Diferentes estudios relacionaron claramente el fenotipo y el genotipo acetilador deficiente con el cáncer de vejiga. Muchos estudios han confirmado estos resultados siendo esta asociación aún más evidente cuando los pacientes se encuentran ocupacionalmente expuestos a aminas cancerígenas. [16]

Con respecto a otros tipos de cáncer existen trabajos con resultados contradictorios, siendo una de las razones el número pequeño de individuos estudiados, lo cual da por resultado la imposibilidad de llegar a conclusiones sólidas. El cáncer de laringe fue relacionado con acetiladores deficientes. El cáncer de pulmón fue relacionado a individuos homocigotos acetiladores rápidos, pero no ha existido confirmación posterior. La misma situación se presenta para el cáncer de mama, donde se han observado asociaciones iniciales con posibles acetiladores rápidos, pero de igual manera no existe ninguna confirmación ni de genotipo o de fenotipo [4].

En cuanto a otras enfermedades diferentes del cáncer las más estudiadas han sido la artritis reumatoide, la enfermedad de Parkinson y el lupus eritematoso sistémico, en la única en la que se han obtenido conclusiones sólidas ha sido en el lupus eritematoso inducido por fármacos, en donde se le ha relacionado claramente con acetiladores deficientes, siendo exclusivo de ellos. La posible patogenia de este trastorno es que aquellos individuos acetiladores deficientes al tener un mayor porcentaje de fármaco no acetilado, el cual sigue rutas metabólicas alternativas, interaccionando con macromoléculas celulares, dando lugar a sustancias que son reconocidas como autoantígenos, provocando de esta manera la respuesta inmunitaria[14].

Vale la pena mencionar que otro problema que puede presentarse debido al polimorfismo acetilador son los efectos adversos causados por fármacos.

Los acetiladores deficientes presentan mayor riesgo de presentar efectos adversos o incluso daño hepático debido a que tienen concentraciones plasmáticas de fármaco elevadas.

I.IV Sulfametazina

La sulfametazina (SMZ) es un fármaco antibacteriano de amplio espectro, que alcanza altos niveles hemáticos en poco tiempo y se mantiene en sangre por su alta reabsorción.

En cuanto a su mecanismo de acción; la sulfametazina tiene efecto bactericida por su actividad inhibitoria sobre la síntesis de ácido fólico. Las bacterias sintetizan el ácido fólico intracelularmente, las sulfas producen su efecto por inhibición competitiva de la enzima dihidrofolato sintetasa, encargada de la incorporación del ácido para-aminobenzoico (PABA) a la molécula para la síntesis de ácido fólico.

Cabe mencionar que la sulfametazina es un sustrato específico de la NAT2 por lo cual sufre una reacción de N-acetilación (**Figura 3**)

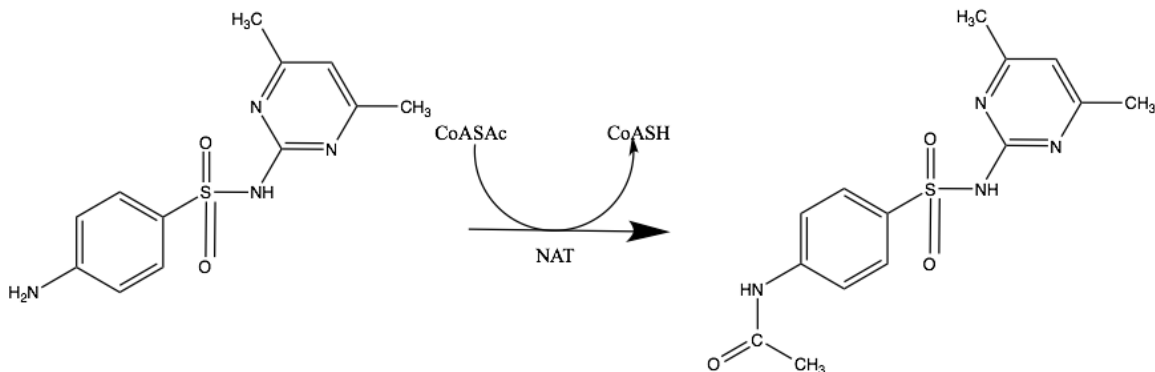


Figura 3.- Mecanismo resumido de la formación del metabolito N-acetilado de la sulfametazina, la acetilsulfametazina.

Debido a esa característica la sulfametazina puede utilizarse como fármaco de marcaje para estudios que permitan identificar el fenotipo de acetilación de individuos en una población, como es el caso del presente trabajo.^[9]

I.IV.I Efectos secundarios de la sulfametazina

- a) Reacciones de hipersensibilidad: A nivel cutáneo se observan desde eritemas leves a dermatitis necrotizante, eritema multiforme, síndrome de Steven Johnson. Otras reacciones son: vasculitis y reacciones sistémicas de tipo anafilaxia severa.
- b) Trastornos digestivos: náuseas, vómitos, diarrea.
- c) Alteraciones hematológicas: anemia hemolítica en pacientes con déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, anemia megaloblástica (por su acción antifólica), aplasia medular.
- d) Trastornos hepáticos: desde alteraciones leves a necrosis hepatocítica.
- e) Alteraciones renales: obstrucción de las vías urinarias.

I.IV.II Uso de la sulfametazina en estudios de fenotipo acetilador

El uso de sulfametazina para determinar el fenotipo acetilador ha sido ampliamente documentado. Inicialmente se utilizaba el método descrito por Bratton y Marshall, el cuál fue uno de los más usados en ensayos clínicos para determinar la proporción de sulfametazina y su metabolito acetilado, acetilsulfametazina (AcSMZ) en diversos fluidos biológicos como sangre, orina, suero o plasma. Actualmente se emplean métodos basados en HPLC.

En un estudio realizado por Rao y cols. (1970) para determinar la acetilación de isoniazida (INH) y SMZ en una población hindú sugiere que un individuo puede ser clasificado como acetilador deficiente si el porcentaje de acetilación de SMZ en orina de 5-6 h después de su ingesta es menor al 70%, en cambio puede clasificarse como un acetilador rápido si es mayor al 70%. En la figura 4 se muestran los resultados para sulfametazina que obtuvieron en este estudio.

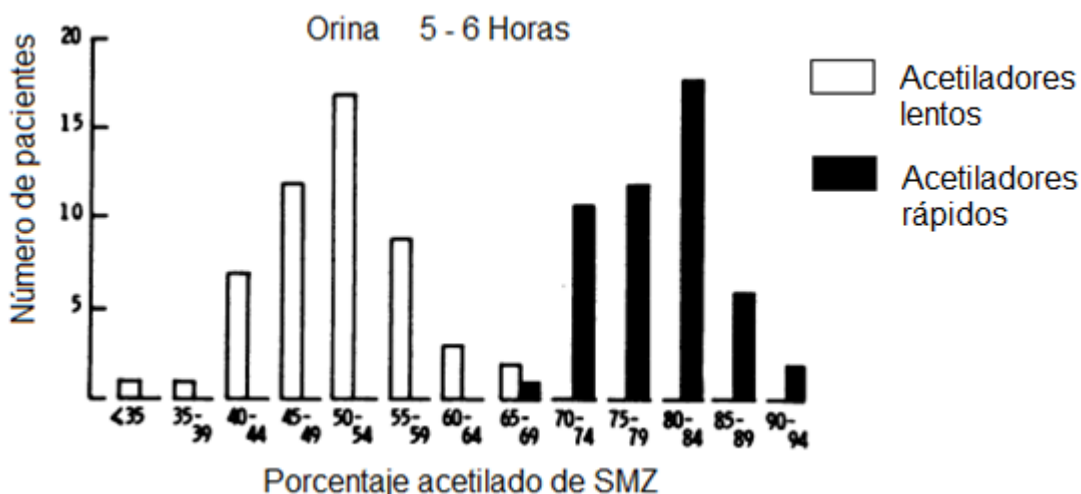


Figura 4-. Número de pacientes de una población Hindú contra el porcentaje de SMZ acetilado en una muestra de orina de 5 a 6 horas. Cada paciente recibió una dosis de 44 mg/Kg de peso de SMZ por vía oral. Los sujetos fueron fenotipados como acetiladores rápidos o lentos de SMZ de acuerdo al método descrito por Bratton y Marshall. En este estudio no se especifica la edad, ni el sexo, ni el peso corporal de los pacientes.

En otro estudio donde participaron 279 pacientes de una población en Singapur fueron fenotipados con SMZ colectando muestras de orina de (5-6 h) y muestras de sangre (6 h) después de la ingesta de una dosis de 40 mg/kg de peso, la cual fue ingerida en ayunas. Los puntos de corte en este estudio para distinguir entre acetiladores rápidos o deficientes fueron, con respecto al porcentaje de fármaco metabolizado, de 43 % para muestras de sangre y 70% para muestras de orina, o índices metabólicos de AcSMZ con respecto a SMZ de 0.75 y 2.33 respectivamente, los puntos de corte fueron determinados en base a un análisis probits. Utilizando estos criterios, 129 pacientes fueron clasificados como deficientes acetiladores y 344 como rápidos acetiladores. Sin embargo 6 pacientes dieron resultados conflictivos debido a que sus muestras de plasma indicaban que eran acetiladores lentos y sus muestras de orina indicaban que eran acetiladores rápidos. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 5. [20]

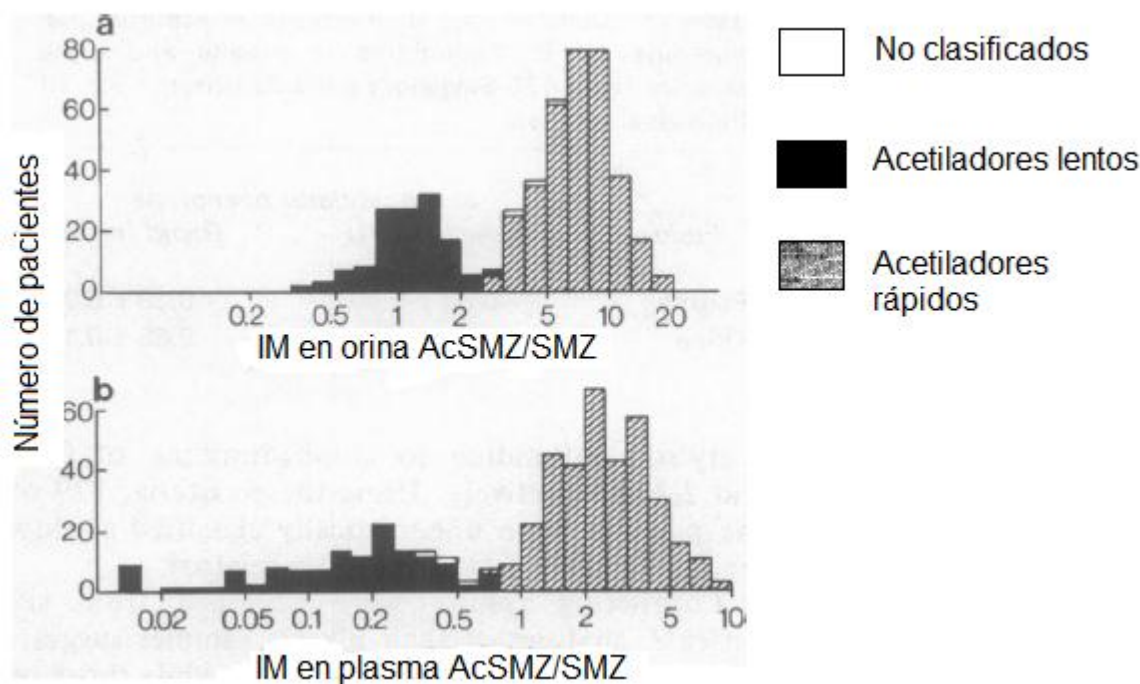


Figura 5.- Distribución de 479 pacientes en Singapur de acuerdo a su índice metabólico de AcSMZ y SMZ, en la gráfica (a) se encuentran los resultados obtenidos en muestras de orina, en la gráfica (b) se muestran los resultados obtenidos en plasma. No se especifica, edad, sexo o peso de los pacientes fenotipados.

I.V. Introducción a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia o high performance liquid chromatography (HPLC, por sus siglas en inglés) es un tipo de cromatografía en columna ampliamente utilizada no sólo en laboratorios sino también a nivel industrial. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Existen diferentes tipos de cromatografía líquida, pero en el caso del presente trabajo nos enfocaremos en la cromatografía líquida de fase reversa. En la cual la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar.

I.V.I Cromatografía de fase reversa

La técnica de fase reversa, RPC (del inglés Reverse Phase Chromatography), se ha convertido en el tipo de cromatografía más ampliamente utilizada en HPLC. Esta técnica proporciona retención y selectividad óptimas cuando las muestras

tienen un carácter predominante alifático o aromático, como es el caso de los analitos de este estudio.

En este tipo de cromatografía la separación de basa principalmente en la partición del analito entre una fase móvil ligeramente polar y una fase estacionaria hidrofóbica (no polar), habiendo otros fenómenos involucrados tales como la adsorción, una mezcla de los fenómenos de adsorción-partición, o la teoría solvofóbica de Horvath, la cual indica que la interacción entre moléculas de soluto y de solvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil, forzado a interactuar por mayor tiempo con la fase estacionaria que actúa como receptor pasivo.

En la figura 6 se muestra un esquema de la interacción simplificada de los analitos no polares y su fuerte interacción con los grupos C18 ligados al soporte de silica sólida.

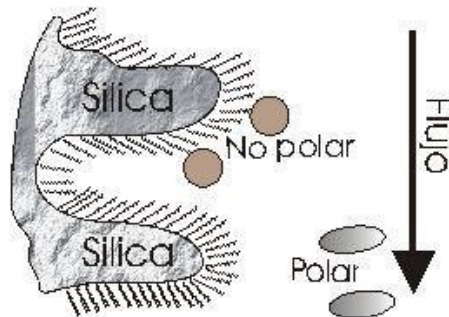


Figura 6.- Esquema de la fase estacionaria no polar y su interacción con analitos polares y no polares

La RPC puede proporcionar información cuantitativa, gracias a los diferentes detectores, lo cual le da un impacto de aplicación aún mayor a esta técnica. La cuantificación en RPC se basa en la comparación del área del pico del compuesto problema con las de uno o más estándares. [4]

Los instrumentos cromatográficos ya están equipados con integradores electrónicos digitales los cuales permiten una precisa estimación del área de los picos.

I.VI. Conceptos básicos

I.VI.I. Tiempo de retención (T_R)

Se le conoce como tiempo de retención al tiempo que tarda un analito en salir de la columna, el cuál interacciona con ella siendo detectado, esto quiere decir que es el tiempo desde que se inyecta la muestra, hasta el tiempo en que se detecta el pico máximo de la muestra. **(Figura 7)**

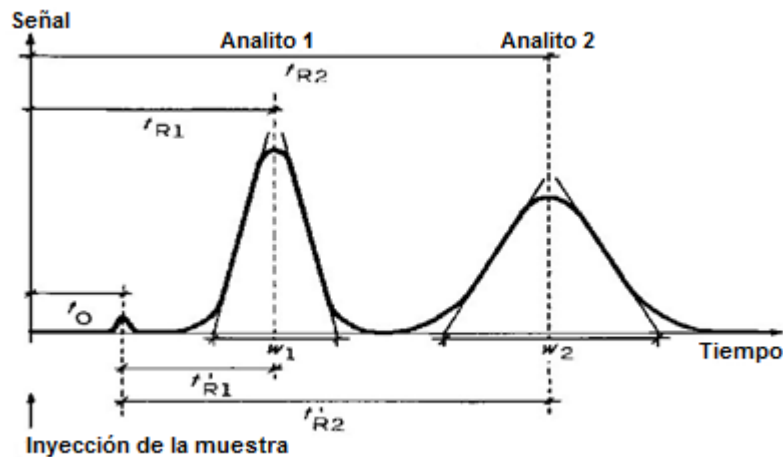


Figura 7.- Figura en la que se muestran dos señales, cada una correspondiente a un analito diferente. t_{R1} y t_{R2} , corresponden a los tiempos de retención de los analitos 1 y 2, respectivamente, t_0 , corresponde al tiempo muerto (T_M), t'_{R1} y t'_{R2} , corresponden a los tiempos de retención ajustados de los analitos 1 y 2, respectivamente, finalmente w_1 y w_2 corresponden al ancho del pico.

I.VI.II. Tiempo muerto (T_M)

Tiempo que tarda una sustancia, en atravesar físicamente a la fase estacionaria, esta sustancia no interacciona con la fase estacionaria pero, presenta una señal en el detector.

La relación entre el tiempo muerto y el tiempo de retención se expresa con la ecuación de tiempo de retención ajustado (T'_R):

$$T'_R = T_R - T_M$$

I.VI.III. Factor de capacidad (k)

También conocido como factor de retención o resolución, es el grado de retención de los diferentes componentes de una muestra en la columna. k se

define como el tiempo relativo que el soluto reside en la fase estacionaria con respecto al tiempo que reside en la fase móvil. El factor de capacidad se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$k = \frac{T_R - T_M}{T_M}$$

Los valores de k deben estar idealmente entre 1 y 10, ya que si $k=0$ indica que el analito no está interaccionando con la fase estacionaria y eluye junto con el solvente a través de la columna, en cambio si $k>10$ indica que el analito es altamente retenido en la fase estacionaria.

I.VI.IV. Factor de separación (α)

El factor de separación o factor de selectividad, es una medida de la retención relativa o separación de dos o más analitos, lo cual es lo que se desea hacer en un método por HPLC.

El factor de separación se calcula con la siguiente ecuación:

$$\alpha = k_2/k_1$$

Usualmente, el factor de capacidad del último de los picos adyacentes es colocado en el numerador de la ecuación anterior por lo que el valor de α es mayor a 1. **(Figura 8)** El factor de separación es una medida de selectividad de un sistema cromatográfico.

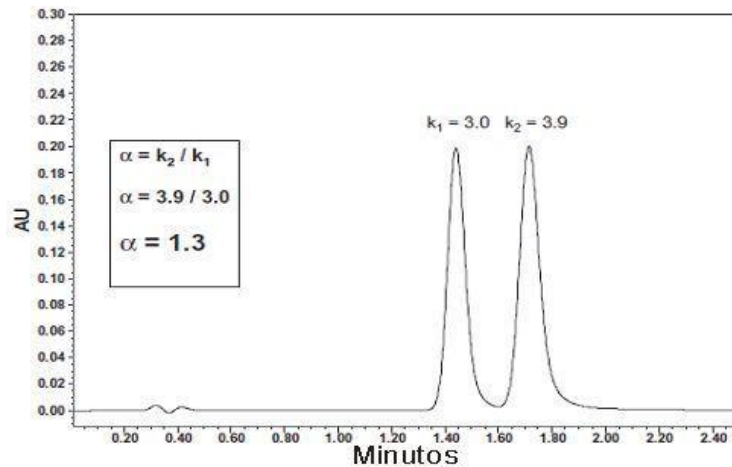


Figura 8.- Cromatograma donde se ejemplifica la forma de obtener α . La comparación siempre debe hacerse sólo entre dos picos o señales.

I.VI.V. Platos teóricos

El número de platos teóricos (N) es una medida de la eficiencia de la columna, es decir, la eficiencia es la capacidad de la columna para producir picos definidos y con una separación aceptable.

El número de platos teóricos se define con la siguiente ecuación:

$$N = \left(T_R / \sigma \right)^2$$

N está definida como el cuadrado de la relación del tiempo de retención dividido por la desviación estándar del pico (σ). La longitud o ancho del pico es aproximadamente 5σ para un pico Gaussiano.

Debido a que es más difícil medir la desviación estándar del pico (σ) que la longitud de éste, hay una interrelación usando la longitud a la anchura media del pico ($w_{1/2}$), la cual es generalmente utilizada en métodos reportados en la USP.

Entonces nuestra ecuación sería la siguiente:

$$N = 5.546 \left(T_R / w_{1/2} \right)^2$$

I.VI.VI.Resolución (R_s)

La resolución es la medida del grado de separación de dos analitos adyacentes y se define como la diferencia de los tiempos de retención de dos picos dividido por la longitud media de los picos

La resolución está definida por la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left(\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2} \right)} = \frac{\Delta t_R}{\bar{w}_b}$$

Cabe mencionar que si $R_s=0$ indica que no hay separación en los picos, por lo tanto R_s debe ser mayor a 1.5 para que exista una separación adecuada.

Existe una ecuación donde se relaciona la resolución con el factor de separación, el factor de capacidad y el factor de eficiencia o los platos teóricos.

Para cambiar los factores implicados en la resolución y por lo tanto mejorar la

$$R_s = 1/4 \underbrace{\left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right]}_{\text{Factor de Separación}} \cdot \underbrace{\left[\frac{k}{(1 + k)} \right]}_{\text{Factor de Capacidad}} \cdot \underbrace{N^{1/2}}_{\text{Factor de Eficiencia}}$$

separación cromatográfica, se cuenta con una serie de modificaciones aplicables a las condiciones cromatográficas, dichas modificaciones son:

- Cambio del solvente de la fase móvil o sus proporciones
- Cambio de pH de la fase móvil
- Cambio de la fase estacionaria
- Cambio de temperatura

I.VI.VII. Asimetría (As)

En condiciones ideales, los picos cromatográficos deben tener una forma de pico Gaussiano, con simetría, aunque en realidad no lo sean.

El factor de asimetría (As) se utiliza para medir el grado de simetría del pico y es definida en el largo del pico a 10% de su altura. El margen permitido para Ases de 0.8 a 1.5 (**Figura 9**)

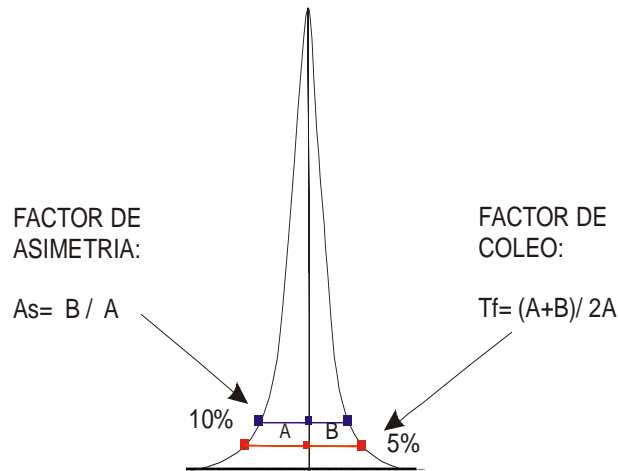


Figura 9.- Cromatograma donde se ejemplifica como obtener el factor de asimetría y el factor de coleo. Donde: A= Tiempo en minutos calculado desde el inicio del pico (a la respectiva altura) hasta la mitad del mismo; B= Tiempo calculado desde la mitad del pico (a la respectiva altura) hasta el final del pico)

I.VI.VIII. Factor de coleo (T_f)

El Factor de coleo (T_f) es un término similar al de factor de asimetría. El T_f es calculado usando el ancho del pico al 5% de la altura del mismo, y se calcula por la siguiente ecuación:

$$T_f = \frac{A + B}{2A}$$

En la figura 9, se presenta un ejemplo para calcular T_f. Los valores de T_f deben encontrarse preferentemente entre .05 y 2.

I.VII. Validación

La validación de un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, es decir su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el o los usuarios, para poder resolver un problema analítico particular.

Dichos requisitos de carácter estadístico, son los que debe poseer el método, estos parámetros son:

- Linealidad
- Selectividad
- Precisión
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Robustez

La importancia de validar un método reside en que propicia seguridad y confiabilidad en sus datos y procedimientos.

Existen tres tipos de validación, los cuáles se explican a continuación:

Validación Prospectiva: consiste en el establecimiento de la evidencia documentada de que un método analítico realiza aquello para lo que fue diseñado, definiendo de antemano los valores en los cuales deben estar sus parámetros estadísticos. Este tipo de validación será la que se realizará en el presente estudio.

Validación Simultánea: Es el establecimiento de la evidencia documentada de que un método analítico realiza aquello para lo que fue diseñado, basándose en la información generada durante la ejecución real del proceso, o bien la comprobación documentada, de que los procedimientos de análisis hacen

posible la evaluación de la muestra bajo estudio, con suficiente y definida confiabilidad.

Validación Retrospectiva: el establecimiento de la evidencia documentada de que un método realiza aquello para lo que fue diseñado, basándose en la revisión y análisis de información histórica.

I.VII.I Linealidad

La linealidad de un método se define como la relación entre la respuesta del instrumento y concentraciones conocidas de analito.

Para determinar la linealidad, se hace una curva de calibración con al menos 6 concentraciones conocidas, se determina la curva de regresión por el método de mínimos cuadrados a partir de la ecuación de la línea recta:

$$y = mx + b$$

Donde b= ordenada al origen

m= pendiente

Independientemente de la apariencia que pueda tener la recta, deben evaluarse los estimadores de regresión lineal:

- Coeficiente de regresión lineal (r): se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto, $y=a+bx$
- Pendiente (m): es un parámetro indicativo de la sensibilidad del método.
- Ordenada al origen (b): se puede obtener la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación puede adjudicarse a un error sistemático, además de que sirve para determinar otros parámetros como el límite de detección (LOD)

I.VII.II Selectividad

Se define como la capacidad de un método analítico para medir el analito en cuestión, en presencia de otras sustancias mezcladas entre sí.

Algunos autores mencionan equivalencias entre los términos de especificidad y selectividad, pero algunos los diferencian, dando por definición de selectividad como la capacidad de detectar simultáneamente a sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra, estos pueden ser impurezas, productos de degradación o componentes de la matriz, y como definición de especificidad, tenemos que es la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto.

I.VII.III Precisión

La precisión del método analítico describe la cercanía (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas de múltiples repeticiones de una muestra bajo las condiciones establecidas de análisis.

La precisión es matemáticamente expresada como la desviación estándar σ , estimada analíticamente por s o comúnmente como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV)

La ecuación del estimador s de la desviación estándar se calcula de la siguiente forma:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde n = Número de medidas

X_i = Valor medido en el ensayo

\bar{X} = Estimador de la media poblacional

I.VII.IV Repetibilidad

Es un parámetro que permite observar la precisión de un método cuando este se desarrolla bajo las mismas condiciones, en el mismo equipo, por el mismo analista utilizando la misma muestra, en el mismo laboratorio y en la misma sesión de trabajo en un periodo corto. El parámetro estadístico, utilizado para medir repetibilidad es el coeficiente de variación (CV) que corresponde a medir la dispersión de los datos alrededor de la media, el CV es calculado de la siguiente manera:

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{X}} \right) \times 100$$

Donde s= desviación estándar de los datos

\bar{X} = media de los datos

I.VII.V Reproducibilidad

Es la medida de la precisión de los resultados de un método realizado en una muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en diferentes sesiones de trabajo.

Otra definición indica que la reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (y/o analistas) en un estudio en colaboración. El cálculo de la reproducibilidad se hace por medio del coeficiente de variación (CV).

I.VII.VI Límite de detección

El límite de detección de un analito se define como aquella concentración más pequeña del analito que puede ser detectada por una única medición con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.

La cantidad mínima detectable de un analito se refiere a la concentración más pequeña que puede ser detectada realmente.

La ecuación para detectar LD es la siguiente:

$$LD = b + 3s_{y/x}$$

Donde b= ordenada al origen

$S_{y/x}$ = error estándar de estimación, que es un parámetro estadístico el cual calcula el error estándar pero en dirección de y, la fórmula para calcularlo es la siguiente:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

I.VII.VI Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es considerado como la concentración más baja para mediciones cuantitativamente precisas.

Siendo definido por la siguiente ecuación:

$$LQ = b + 10s_{y/x}$$

I.VII.VII Robustez

Se define como el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante la ejecución del método sobre la misma muestra variando algunas condiciones, que pueden ser: equipo, reactivos, analistas, temperatura, pH, flujo, proporciones de la fase móvil, etc.

Este parámetro se calcula de igual forma que el coeficiente de variación (CV).

I.VII.VII Método de calibración con estándar interno

En el presente trabajo se utilizó la calibración con estándar interno, la cual consiste en la adición de un compuesto diferente al analito a cada una de las muestras a analizar. Se analizan soluciones de muestra de diferentes concentraciones a las que se les ha añadido la misma cantidad de estándar interno.

Los datos obtenidos se corrigen con el estándar interno de la siguiente manera:

$$C' = C/SI$$

Donde C= señal obtenida de la sustancia de interés

SI= señal obtenida del estándar interno

Los requerimientos para un estándar interno son los siguientes:

- Tener buena resolución ($R_s > 1.25$)
- Factor de capacidad similar al compuesto problema
- El compuesto que se utilice como estándar interno no debe estar presente en la muestra original
- Características químicas similares a los analitos de interés

II. HIPÓTESIS

Se demostrará que existen diferencias entre el fenotipo acetilador de la población mexicana, con respecto al de fenotipo acetilador que se tienen reportados de poblaciones europeas, los cuáles se sabe que tienen un fenotipo acetilador lento, aproximadamente del 80 al 70% son acetiladores deficientes. Por lo tanto se pretende demostrar que la población mexicana tiene un fenotipo acetilador diferente al de las poblaciones europeas.

III. JUSTIFICACIÓN

Es bien sabido que todos los individuos corren riesgos de presentar efectos adversos a fármacos, interacciones e incluso toxicidad, cuando se está en un tratamiento. Sobre todo si el tratamiento requiere de tiempos prolongados para su efectividad.

Por lo explicado en la introducción sabemos que el polimorfismo genético juega un papel muy importante en cuanto a los riesgos que se pueden correr al consumir un fármaco pero, desafortunadamente, en México hay muy poca información al respecto debido mayoritariamente, a la falta de estudios farmacogénéticos en nuestra población. Ante la falta de evidencia, se da por hecho que somos parecidos a los europeos debido a nuestro mestizaje, y se usa la bibliografía reportada para los europeos al momento de administrar un fármaco. Sin embargo no es posible estar seguros de que efectivamente nuestra capacidad acetiladora sea muy parecida a la de los caucásicos y tampoco se puede tener la certeza de que la terapéutica que se está llevando a cabo sea acertada.

Al llevar a cabo un estudio de fenotipo acetilador en población mexicana se puede tener una idea del comportamiento poblacional, frente a algunas sustancias, y con respecto a fármacos, mejorar la terapéutica para algunas enfermedades.

IV. OBJETIVO

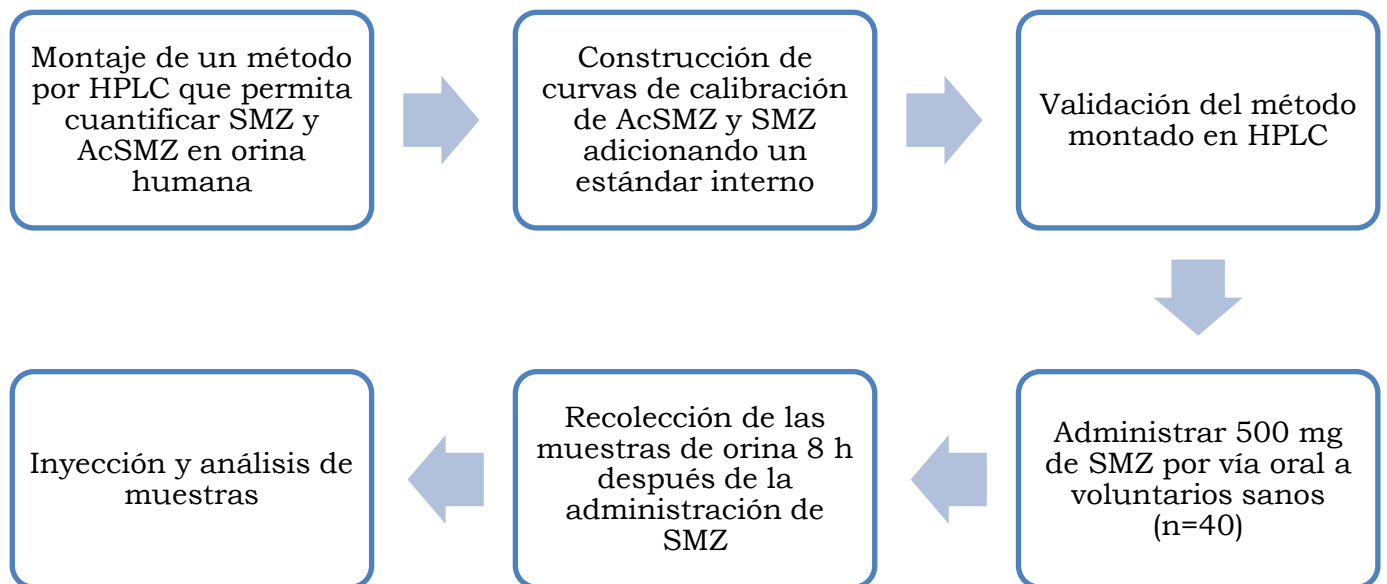
Realizar un estudio farmacogenético preliminar en población mexicana, donde se pueda determinar fenotípicamente su capacidad como acetiladores, y comparar semejanzas y diferencias con otras poblaciones.

Objetivos particulares

- Desarrollar un método de HPLC en el cuál se permita cuantificar a la sulfametazina y a su metabolito acetilsulfametazina en muestras de orina de voluntarios sanos.
- Validar el método desarrollado mediante las pruebas de repetibilidad, linealidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y robustez, empleando un estándar interno.

V. METODOLOGÍA

Posterior a la realización de una búsqueda bibliográfica se procederá a la parte de desarrollo y validación de un método analítico que nos permita construir curvas de calibración de sulfametazina y acetilsulfametazina; y que también nos permita cuantificar ambos analitos en muestras de orina de voluntarios.



V.I Validación del método analítico

Una vez encontradas las condiciones de separación del método analítico para la determinación de sulfametazina y acetilsulfametazina por medio de HPLC, se recolectó orina de 5 voluntarios sanos para desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de SMZ y AcSMZ en orina humana por HPLC, a estos voluntarios se les pidió que recolectaran una muestra de orina sin haber ingerido el fármaco, sin haber consumido café o algún otro alimento y/o bebida que contenga cafeína, y sin haber ingerido bebidas alcohólicas. El propósito de

esto es construir un pool de orina para las curvas de calibración de SMZ y AcSMZ, con el fin de predecir el comportamiento de la orina en las muestras a analizar. Cabe mencionar que estos 5 voluntarios sanos forman parte del estudio, en el que posteriormente se cuantificó su capacidad acetiladora. Para el estudio en el que cuantificamos la capacidad acetiladora se requirieron 40 voluntarios en total.

Como ya se mencionó anteriormente, el éxito en la aplicación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia para un analito determinado depende la combinación correcta de las condiciones de operación con esto nos referimos a: la columna, la velocidad de flujo, la fase móvil, la longitud y el diámetro de la columna.

La cantidad de los analitos de interés, que en este caso serán SMZ y AcSMZ, se determinarán a partir de: a) determinar las condiciones de operación para identificar a los analitos de interés y la posterior inyección de las muestras en los equipos, b) un proceso de dilución en la matriz biológica (orina), c) la construcción de las curvas de calibración de los analitos de interés corregidas con la adición de un estándar interno, d) obtener las absorbancias de los analitos en las muestras y extrapolarlas en la curva de calibración realizada previamente.

V.I.I Condiciones de separación de las muestras

Se montará un método en un equipo de HPLC-Varian ProStar con detector UV/VIS y una columna de 30 cm LiChrospher 100

Se evaluaron las siguientes condiciones:

- I Buffer fosfato de sodio monobásico .01 M 63% + Metanol (grado HPLC)
37% (v/v)
°T= 20 °C λ= 268 nm pH_{buffer}=3.3
Flujo= 1 ml/min

Las muestras a probar se preparan de la siguiente manera:

- 1) Se preparan soluciones a una concentración de 20 µg/ml de SMZ y AcSMZ respectivamente, disueltas en metanol grado analítico
- 2) De las soluciones patrón se toma una alícuota de 1 ml y se traspasa, cada alícuota a un tubo de ensaye rotulado con el nombre de cada uno de los respectivos analitos, donde se deja evaporando en una gradilla a temperatura ambiente, protegido de la luz solar directa
- 3) Una vez que se ha evaporado por completo el metanol se procede a reconstituir las muestras con fase móvil
- 4) Se colocan las muestras reconstituidas en agitación con vortéx por 30 s
- 5) Se procede a la inyección de las muestras por separado y en mezcla

La razón de haber escogido estas condiciones es que en el método desarrollado por Villascán, en 2015, reporto condiciones que muestran separación idónea de sulfametazina y acetilsulfametazina. Sin embargo al inyectar ambas muestras por separado obtuvimos los siguientes resultados.

	AcSMZ	SMZ
Tiempo de retención	7.2	7.04
Tiempo de retención ajustado	6.59	6.43
Factor de capacidad (k)	9.69	9.46

Tabla 3.- En esta tabla se muestran los resultados de los cromatogramas obtenidos al inyectar los analitos con el método propuesto por Villascán, 2015. El tiempo de retención esta dado en minutos

Como se puede observar en la tabla los tiempos de retención son muy cercanos, por lo tanto cuando se inyectaron ambos analitos en mezcla, sólo se obtuvo un pico ancho, lo cual indica que no hay separación de las muestras. Debido a esto se procede a probar otras condiciones.

II Buffer fosfato de sodio monobásico .01 M 77% + Acetonitrilo (grado HPLC) 23% (v/v)

°T= 20 °C λ= 268 nm pH_{buffer}=3.3

Flujo= 0.5 ml/min

Las muestras a inyectar se preparan como se indicó para las condiciones anteriores y se obtuvieron los siguientes resultados.

	AcSMZ	SMZ
Tiempo de retención	9.5	10.37
Tiempo de retención ajustado	8.82	9.69
Factor de capacidad (k)	12.97	14.25
Factor de separación	1.0986	

Tabla 4.- En esta tabla se muestran los resultados de los cromatogramas obtenidos al inyectar los analitos con las nuevas condiciones. El tiempo de retención esta dado en minutos. La separación de ambos analitos es aceptable dado que $\alpha > 1$

Al analizar los datos se observa que ambos analitos tienen una separación adecuada, sin embargo, el tiempo de las corridas se hace muy largo. Aun así se procede a inyectar la muestra de la matriz biológica para determinar si el ruido no interfiere con los analitos.

La matriz biológica se prepara para inyección de la siguiente manera:

- 1) Tomar 3 ml de pool de orina y centrifugar a 3000 rpm durante 10 min
- 2) Tomar 1 ml de orina centrifugada, trasvasar a un tubo de ensayo y llevar a un volumen final de 10 ml (1:10) con fase móvil
- 3) Agitar en el vortéx durante 30 s
- 4) Se procede a la inyección de la dilución de la matriz biológica

Al inyectar la orina, se observó que el ruido presentaba interferencias con los analitos de interés, antes de considerar un método de extracción con solvente orgánico de las muestras, se procedió a cambiar las condiciones nuevamente.

III Buffer fosfato de sodio monobásico .01 M 75% + Acetonitrilo (grado HPLC) 25% (v/v)

$^{\circ}T = 20 \text{ }^{\circ}C$

$\lambda = 268 \text{ nm}$

$pH_{\text{buffer}} = 3.3$

Flujo= 1 ml/min

Al inyectar las muestras tanto por separado como en mezcla se obtuvieron los siguientes resultados.

	AcSMZ	SMZ
Tiempo de retención	4.81	6.10
Tiempo de retención ajustado	4.13	5.42
Factor de capacidad (k)	6.07	7.97
Factor de separación	1.3123	

Tabla 5.- En esta tabla se muestran los resultados de los cromatogramas obtenidos al inyectar los analitos con las nuevas condiciones. El tiempo de retención esta dado en minutos. La separación de ambos analitos es aceptable dado que $\alpha > 1$

Al inyectar la matriz biológica de la manera descrita en el aparatado anterior, se pudo observar que el ruido ya no interfería con nuestros analitos. Por lo que se procedió a inyectar a ambos analitos reconstituidos en la matriz biológica de la siguiente manera:

- 1) De las soluciones patrón, anteriormente preparadas, se toma una alícuota de 1 ml y se traspasa, cada alícuota a un tubo de ensaye rotulado con el nombre de cada uno de los respectivos analitos, donde se deja evaporando en una gradilla a temperatura ambiente, protegido de la luz solar directa
- 2) Por otra parte, tomar 3 ml de pool de orina y centrifugar a 3000 rpm durante 10 min
- 3) Tomar 1 ml de orina centrifugada, trasvasar a un tubo de ensayo y llevar a un volumen final de 10 ml (1:10) con fase móvil
- 4) Agitar en el vortéx durante 30 s
- 5) Una vez que se ha evaporado por completo el metanol se procede a reconstituir las muestras con la dilución de pool de orina
- 6) Se colocan las muestras reconstituidas en agitación con vortéx por 30 s
- 7) Se procede a la inyección de las muestras por separado y en mezcla

V.II.II Elección del estándar interno

Las sustancias a probar como estándar interno se inyectaron por triplicado bajo las mismas condiciones en las que se separó a la sulfametazina y acetilsulfametazina, para posteriormente inyectarlos con los analitos y la matriz biológica, con el fin de observar si existe alguna interferencia o interacción entre estos analitos. Se elaboraron soluciones de los estándares a una concentración de 20 µg/ml.

Se pesó .020 g de cada estándar interno (sulfaguanidina, sulfatiazol, sulfametoxazol y cafeína) se depositó cada pesada en un matraz volumétrico de 10 ml, el cuál fue rotulado con el nombre del respectivo estándar y aforado con metanol grado analítico, se mezcló cada solución en el vortéx durante 30 s, posteriormente se toma una alícuota de 1 ml de la solución preparada y se deposita en un tubo de ensaye de 5 ml, para finalmente evaporar el metanol de dicha alícuota 1ml, a baño María cuidando que la temperatura no sobrepase los 60°C, se reconstituirá primero con fase móvil y se procederá a su inyección.

Las condiciones cromatográficas para todas las muestras fueron las siguientes:

Buffer fosfato de sodio monobásico .01 M 75% + Acetonitrilo (grado HPLC) 25% (v/v)

$$^{\circ}T= 20 ^{\circ}C$$

$$\lambda= 268 \text{ nm}$$

$$\text{pH}_{\text{buffer}}=3.3$$

Flujo= 1 ml/min

Al inyectar la sulfaguanidina, el pico del cromatograma se desdoblaba en dos, esta sustancia se descartó como estándar interno, debido a que nuestra fase móvil no la resuelve de manera adecuada.

El sulfatiazol, presentaba sólo una señal en forma de pico Gaussiano, pero desafortunadamente su tiempo de retención era de 5 min e interfería con la señal de acetilsulfametazina, de igual manera esta sustancia fue descartada.

El sulfametoxazol también presentaba una señal en forma de pico Gaussiano, pero su tiempo de retención era de 13.72 min, al salir con tanto tiempo de separación de los analitos, alargaba nuestro tiempo de corrida, por lo que se procedió a probar con otra sustancia.

Al inyectar la cafeína fue posible notar la señal en forma de pico Gaussiano, y que presentaba un tiempo de retención de 3.9 min, por esta razón se procedió a inyectar la cafeína en mezcla con los analitos reconstituidos en dilución de orina, siendo la cafeína también reconstituida en dilución de orina después de ser evaporada. **(Figura 10)**

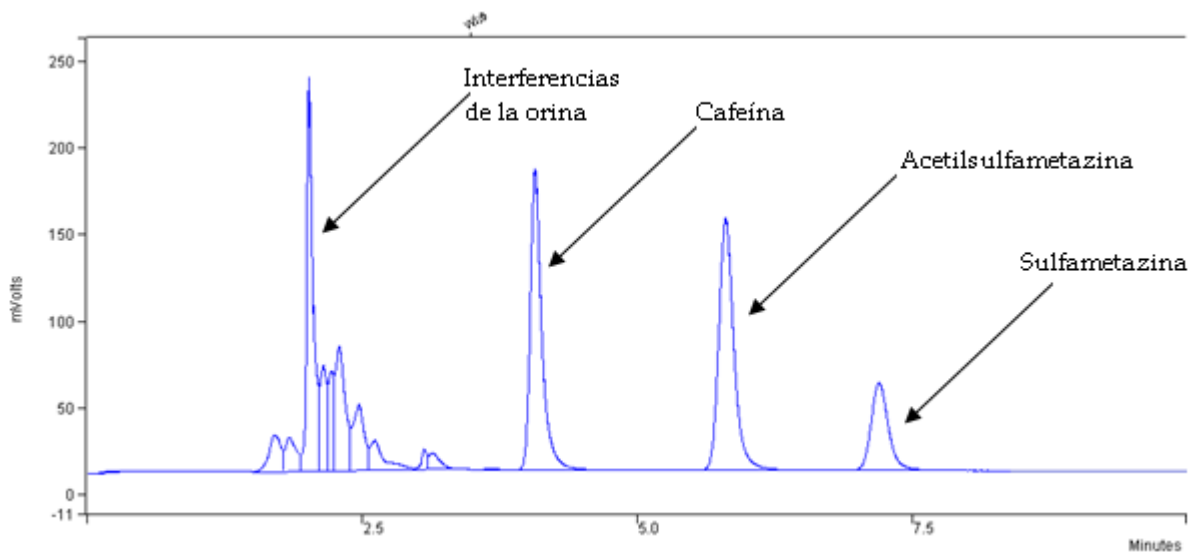


Figura 10.- Cromatograma final donde se observan las interferencias propias de la orina (primer grupo de señales), el estándar interno, cafeína (segunda señal), acetilsulfametazina (tercer señal) y la sulfametazina corresponde a la última señal

V.III Criterios de inclusión y exclusión de voluntarios

Para llevar a cabo la comparación acetiladora en una muestra de la población mexicana será necesario implementar un método analítico y validarlo, el cual permita cuantificar al fármaco sulfametazina y a su metabolito acetilado, acetilsulfametazina. Para ello los voluntarios deben cumplir los siguientes requisitos:

1. No estar bajo tratamiento con medicamentos.

2. Ser voluntarios que no tengan alguna enfermedad crónico-degenerativa ni que hayan cursado por alguna enfermedad hepática o renal
3. El rango de edad será de 20 a 40 años.
4. El sexo no influye en la capacidad acetiladora, así que no hay conflicto si el voluntario es hombre o mujer. Cabe mencionar que en el caso de las mujeres no deben encontrarse embarazadas, ni en periodo de menstruación o lactancia
5. No haber consumido cafeína (café, refresco de cola, chocolate o té) por lo menos 24 h antes de la evaluación. La cafeína al ser metabolizada por la NAT2 puede interferir con las muestras.
6. No haber consumido bebidas alcohólicas por lo menos 48 h antes de la evaluación.
7. Ser de nacionalidad mexicana y que sus bisabuelos sean mexicanos.

A los voluntarios se les informará verbalmente y por escrito, los objetivos del proyecto y de los posibles efectos adversos que pudieran presentar al ingerir el fármaco, una vez dado su consentimiento se les pedirá que firmen una carta de consentimiento y se les indicarán las instrucciones de la toma del fármaco, la forma de recolectar la muestra y se les entregarán las cápsulas y dos contenedores esterilizados para toma de muestras clínicas, los cuáles se les pedirá que llenen con dos muestras de orina respectivamente (blanco y análisis).

V.IV Inicio de la validación del método analítico para cuantificar sulfametazina y acetilsulfametazina en orina humana

Se elaboraron 2 soluciones de sulfametazina (SMZ) y acetilsulfametazina (AcSMZ) en metanol grado analítico, con una concentración de 500 µg/ml y 400 µg/ml cada una de la siguiente manera:

- 1) Se pesaron 0.005 g de sulfametazina, se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con metanol grado analítico, se agitó en vortéx por 30s, se rotuló y refrigeró hasta su uso

- 2) Se pesaron 0.005 g de acetilsulfametazina, se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con metanol grado analítico, se agitó en vortéx por 30s, se rotuló y refrigeró hasta su uso
- 3) Se pesaron 0.004 g de sulfametazina, se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con metanol grado analítico, se agitó en vortéx por 30s, se rotuló y refrigeró hasta su uso
- 4) Se pesaron 0.004 g de acetilsulfametazina, se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con metanol grado analítico, se agitó en vortéx por 30s, se rotuló y refrigeró hasta su uso

A partir de las soluciones antes descritas se obtendrán las siguientes soluciones con las concentraciones de SMZ y AcSMZ: 3.9, 1.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 400 $\mu\text{g/ml}$ las soluciones se harán por separado y por triplicado; para llegar a las concentraciones mencionadas se procede de la siguiente manera con ambos analitos:

- 1) Tomar 1 ml de la solución patrón de 400 $\mu\text{g/ml}$ y trasvasar a un tubo de ensaye de 5 ml [400 $\mu\text{g/ml}$]
- 2) Tomar 1 ml de la solución patrón de 500 $\mu\text{g/ml}$ y trasvasar a un tubo de ensaye de 5 ml, agregar 1 ml de metanol grado analítico y agitar en el vortéx por 30 s [250 $\mu\text{g/ml}$]
- 3) Tomar 1 ml de la solución patrón de 250 $\mu\text{g/ml}$ y trasvasar a un tubo de ensaye de 5 ml, agregar 1 ml de metanol grado analítico y agitar en el vortéx por 30 s [125 $\mu\text{g/ml}$]
- 4) Tomar 1 ml de la solución patrón de 125 $\mu\text{g/ml}$ y trasvasar a un tubo de ensaye de 5 ml, agregar 1 ml de metanol grado analítico y agitar en el vortéx por 30 s [62.5 $\mu\text{g/ml}$]
- 5) Tomar 1 ml de la solución patrón de 62.5 $\mu\text{g/ml}$ y trasvasar a un tubo de ensaye de 5 ml, agregar 1 ml de metanol grado analítico y agitar en el vortéx por 30 s [31.2 $\mu\text{g/ml}$]

- 6) Tomar 1 ml de la solución patrón de 31.2 $\mu\text{g/ml}$ y trasvasar a un tubo de ensaye de 5 ml, agregar 1 ml de metanol grado analítico y agitar en el vortéx por 30 s [15.6 $\mu\text{g/ml}$]
- 7) Tomar 1 ml de la solución patrón de 15.6 $\mu\text{g/ml}$ y trasvasar a un tubo de ensaye de 5 ml, agregar 1 ml de metanol grado analítico y agitar en el vortéx por 30 s [7.8 $\mu\text{g/ml}$]
- 8) Tomar 1 ml de la solución patrón de 7.8 $\mu\text{g/ml}$ y trasvasar a un tubo de ensaye de 5 ml, agregar 1 ml de metanol grado analítico y agitar en el vortéx por 30 s, tomar un mililitro y desechar [3.9 $\mu\text{g/ml}$]

A la par se elaboró la solución de cafeína (CAF, estándar interno) a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de la siguiente manera:

- 1) Se pesó .020 g de cafeína
- 2) Se depositó en un matraz volumétrico de 10 ml, el cuál fue rotulado con el nombre del respectivo estándar y aforado con metanol grado analítico, se mezcló la solución en el vortéx durante 30 s [20 $\mu\text{g/ml}$]

V.IV.I Linealidad del método

Se toma una alícuota de 1 ml de las soluciones patrón de SMZ y AcSMZ y se procede a obtener las concentraciones requeridas, siguiendo la metodología descrita en la página 40, 1 ml de la solución de cafeína [20 $\mu\text{g/ml}$] se coloca en otro tubo de ensayo de 5 ml. Las soluciones de SMZ y AcSMZ se tapan con papel aluminio, el cual es perforado con una aguja, se colocan en una gradilla y se dejan evaporar a temperatura ambiente, en un lugar fresco y protegidas de la luz solar directa. La muestra de cafeína se evapora a baño María a una temperatura de 60 °C. Una vez que las muestras se han evaporado se reconstituyen con 1 ml de pool de orina cada una, se agitan en el vortéx por 30 s, se mezclan entre ellas en uno de los tubos, se agitan en el vortéx nuevamente y se procede a su inyección. Se procesó la dilución para la matriz biológica según la metodología descrita en la página 35.

Los resultados obtenidos se utilizaron para calcular los parámetros de linealidad.

V.IV.II Precisión

Procesar por octuplicado tres puntos de la curva de calibración de SMZ y AcSMZ: 3.9, 31.2 y 400 µg/ml (controles bajo, medio y alto, correspondientemente) y cargado con estándar interno CAF 20 µg/ml, para cada una de las curvas, se procesó la dilución para la matriz biológica según la metodología descrita en la página 35. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar del área de ambos analitos.

V.IV.III Selectividad del método

Se calcularon los parámetros cromatográficos que nos indicaron una correcta separación (factor de capacidad k, factor de separación α) y efectividad en el método cromatográfico (factor de coe, asimetría) Se utilizaron los datos del experimento de precisión del método, en específico el punto de la curva de calibración de SMZ y AcSMZ de 31.2 µg/ml(control medio) y cargado con estándar interno CAF 20 µg/ml.

V.IV.IV Repetibilidad

Se procesó por octuplicado el punto C1 de la curva de calibración de SMZ y AcSMZ a 3.9 µg/ml y CAF 20 µg/ml, se procesó la dilución para la matriz biológica según la metodología descrita en la página 35. A los resultados obtenidos se le calculó el coeficiente de variación del área de ambos analitos

V.IV.V Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

Estos parámetros de validación se calcularon a partir de los resultados de las curvas de calibración aplicando las siguientes ecuaciones:

$$LD = b + 3s_{y/x} \quad LQ = b + 10s_{y/x}$$

Donde b= ordenada al origen $S_{y/x}$ =error estándar de estimación de y.

V.IV.VI Robustez

Las pruebas de robustez se hicieron al tiempo de retención de cafeína, sulfametazina y acetilsulfametazina, ya que las señales propias de la orina se encuentran cerca del pico del estándar interno. Estas interferencias se observan entre 1.3 y 3.1 minutos, por lo cual se hace de particular importancia evaluar las variaciones que pueden afectar el tiempo de retención; cabe recordar las condiciones óptimas de trabajo son:

Buffer fosfato de sodio monobásico .01 M 75% + Acetonitrilo (grado HPLC) 25% (v/v)

$^{\circ}T = 20\text{ }^{\circ}C$

$\lambda = 268\text{ nm}$

$pH_{\text{buffer}} = 3.3$

Flujo= 1 ml/min

Procesar por quintuplicado una muestra de orina de un voluntario cargada con CAF 20 $\mu\text{g/ml}$, para cada uno de las siguientes condiciones modificadas:

- Porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil: 28% y 22%
- Variación en la longitud de onda: 265nm y 271nm
- Cambio en el pH de la fase móvil: 3.3 y 3.6

V.IV.VII Estabilidad de las muestras

Se procederá a inyectar tres de las muestras de orina de voluntarios la cuál fue colectada después de la ingestión del fármaco y las 3 muestras de orina blanco de cada voluntario, a las que se ha analizado previamente, al día posterior de su análisis, 3 días posteriores a su análisis y una semana posterior a su análisis y comparar su comportamiento con respecto a la muestra original.

V.V Prueba del método analítico en muestras de voluntarios sanos

Debido a que el objetivo del presente trabajo es estimar el fenotipo acetilador en voluntarios sanos de nacionalidad mexicana, se aplicó el método desarrollado y validado a muestras de orina, las cuáles fueron colectadas antes y después de la ingesta del fármaco. Se administrará una dosis de 500 mg de sulfametazina a cada uno de los voluntarios, en forma de cápsulas de gelatina dura de 250 mg cada una, en una sola toma.

V.V.I Instrucciones de toma del fármaco y recolección de muestras

Se les solicita a los voluntarios que rotulen ambos contenedores con su nombre, edad, sexo y que a uno lo rotulen como blanco, la muestra del fármaco debe ser recolectada antes de consumir el fármaco. Posteriormente, antes de ir a dormir, los voluntarios deberán ingerir, en una sola toma, las dos cápsulas de sulfametazina con un vaso de agua. Al despertar el día siguiente, en el contenedor restante, deberán recolectar su primer orina del día (8 horas después de la ingesta de las cápsulas), esa será la de orina dónde se espera encontrar a los analitos de interés.

V.V.II Análisis de las muestras

En el momento en que cada uno de sus voluntarios proporcionó sus muestras de blanco y de análisis, se procedió a procesarlas de acuerdo a la siguiente metodología:

- 1) Tomar una alícuota de 3 ml de la muestra blanco a un tubo de ensaye, rotulado con el nombre del voluntario y la palabra blanco, y 5 ml de la muestra de análisis a otro tubo, rotulado con el nombre del voluntario y la palabra análisis, centrifugar a 3000 rpm durante 10 min.
- 2) Tomar 1 ml de la orina centrifugada de blanco y trasvasar a un tubo de ensaye de 15 ml, rotulado de la manera descrita en el paso 1), de igual

forma tomar 1 ml de la orina centrifugada de análisis y rotular correctamente.

- 3) A cada tubo se le añaden 9 ml de fase móvil para diluir la matriz biológica y se someten a agitación en el vortéx por 30 s
- 4) Se procede a la inyección de la orina blanco, bajo las condiciones ya establecidas del método
- 5) Se prepara una solución de cafeína de 20µg/ml según la manera descrita en la página 40, se toma 1 ml, se coloca en un tubo de ensaye de 3 ml y se evapora el metanol a baño María a 60 °C
- 6) Una vez que el metanol se ha evaporado se reconstituye el estándar interno con la orina de análisis, previamente diluida y se procede a su inyección

V.V.III Determinación del fenotipo acetilador

Los resultados de las concentraciones determinadas en las muestras de orina, se expresan como valores de área bajo la curva (AUC), que representan a la intensidad de la señal generada por los analitos con respecto al tiempo, el valor de ABC de cada analito se ajustara por el valor de AUC de estándar interno, una vez corregidos, se determinara se la concentración del Fármaco (SMZ) y del Metabolito (AcSMZ) empleando la siguiente ecuación:

$$concentracion = \left(\frac{(area\ ajustada) - (ordenada\ al\ origen)}{pendiente} \right) factor\ de\ dilucion$$

Donde el factor de dilución=10

$$area\ ajustada = \left(\frac{(area\ analito)}{area\ est.\ interno} \right)$$

Con los valores de las concentraciones de fármaco y de metabolito para cada una de las muestras se calculará el índice metabólico para obtener el fenotipo acetilador de cada uno de los voluntarios de la siguiente manera:

$$\text{Indice Metabolico} = \frac{\text{concentracion del Metabolito en orina}}{\text{concentracion del Farmaco en orina}}$$

Una vez que se obtuvieron los datos de índice metabólico se les calcula el logaritmo base 10 (log) para construir una gráfica de frecuencias de índice metabólico vs voluntarios.

A los datos obtenidos de índice metabólico se les hace un análisis de probits para determinar los tentativos puntos de corte, con la finalidad de determinar los distintos fenotipos acetiladores y la cantidad de voluntarios que corresponden a cada fenotipo, y los porcentajes de cada uno de ellos que representa cada uno de dichos comportamientos con respecto a la población total.

Análisis de probits

En probabilidad y estadística se llama función probit a la inversa de la función de distribución ofunción cuantil asociada con la distribución normal estándar. La función tiene aplicaciones en gráficos estadísticos exploratorios y modelos probit.

Para la distribución normal estándar (a menudo denotada por $N(0,1)$) la función de distribución se denota comúnmente por Φ . Φ es una función sigmoide continua y creciente, cuyos dominio y recorridoson el intervalo $(0, 1)$ y la recta real, respectivamente.

La función probit proporciona el cálculo inverso, generando un valor de una variable aleatoria $N(0, 1)$ asociado a una probabilidad acumulada bajo su curva. Formalmente, la función probit es la inversa de $\Phi(z)$, denotada $\Phi^{-1}(p)$.

En general, $\Phi(\text{probit}(p)) = p$ y $\text{probit}(\Phi(z)) = z$

Este procedimiento mide la relación entre la intensidad de respuesta (índice acetilador) y la proporción de la población que presenta dicha respuesta.

En nuestro caso la ecuación para determinarlo es la siguiente

Probit = (valor individual- valor medio de la población)/ Desviación estándar de la población

$$Probit = \left(\frac{(valor\ individual - valor\ medio\ de\ la\ población)}{desviación\ estándar\ de\ la\ población} \right) + 5$$

VI. RESULTADOS

VI.I Resultados de la validación del método analítico

V.I. I Linealidad del método

Los datos crudos son obtenidos directamente del software Varian WorkStation v 6,1, incluido en el equipo cromatográfico. El cociente analíto/estándar interno se calculó en Excel a partir de los datos crudos obtenidos del equipo cromatográfico, con la finalidad de minimizar los errores aleatorios atribuidos al método analítico y de detección. Dichos cocientes se utilizaron después en el paquete estadístico Statgraphics para calcular los parámetros de linealidad. A continuación se muestran los datos crudos y los cálculos en Statgraphics, para las curvas de calibración por triplicado.

En la gráfica posterior a la tabla se muestra el resultado de la regresión lineal aplicada al cociente de las áreas de sulfametazina/cafeína y acetilsulfametazina/cafeína, mediante el paquete estadístico Statgraphics XV Centurion. Se anexan en esta tabla los resultados del cálculo del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ), obtenidos con las siguientes ecuaciones:

$$LD = b + 3s_{y/x} \quad LQ = b + 10s_{y/x}$$

Conc ($\mu\text{g/ml}$)	AUC _{SMZ}	AUC _{AcSMZ}	AUC _{CAF}	AUC _{SMZ} /AUC _{CAF}	AUC _{AcSMZ} /AUC _{CAF}
3.9	79.9	96.2	220	0.3632	0.4373
3.9	80.1	126	215	0.3726	0.5860
3.9	81.8	147	236	0.3466	0.6229
7.8	166	192	238	0.6975	0.8067
7.8	189	220	226	0.8363	0.9735
7.8	177	224	231	0.7662	0.9697
15.6	328	478	217	1.5115	2.2028
15.6	370	410	226	1.6372	1.8142
15.6	361	416	236	1.5297	1.7627
31.2	671	781	215	3.1209	3.6326
31.2	736	832	222	3.3153	3.7477
31.2	678	835	224	3.0268	3.7277
62.5	1260	1517	239	5.2720	6.3473
62.5	1202	1662	235	5.1149	7.0723
62.5	1436	1575	224	6.4107	7.0313
125	2760	3376	232	11.8966	14.5517
125	2809	2877	222	12.6532	12.9595
125	2807	3389	236	11.8941	14.3602
250	5327	5627	236	22.5720	23.8432
250	5565	5114	231	24.0909	22.1385
250	5570	5530	236	23.6017	23.4322
400	8430	7570	224	37.6339	33.7946
400	8510	8320	227	37.4890	36.6520
400	8520	8400	226	37.6991	37.1681

Tabla 6.-En esta tabla se muestran los datos crudos al hacer por triplicado las curvas de calibración de sulfametazina y acetil sulfametazina adicionándoles cafeína como estándar interno, en las últimas dos columnas se muestran los datos de las áreas bajo la curva de los analitos corregidos con el dato de área bajo la curva del estándar interno. Las áreas bajo la curva están dadas en mVolts²seg.

Gráfico del Modelo Ajustado

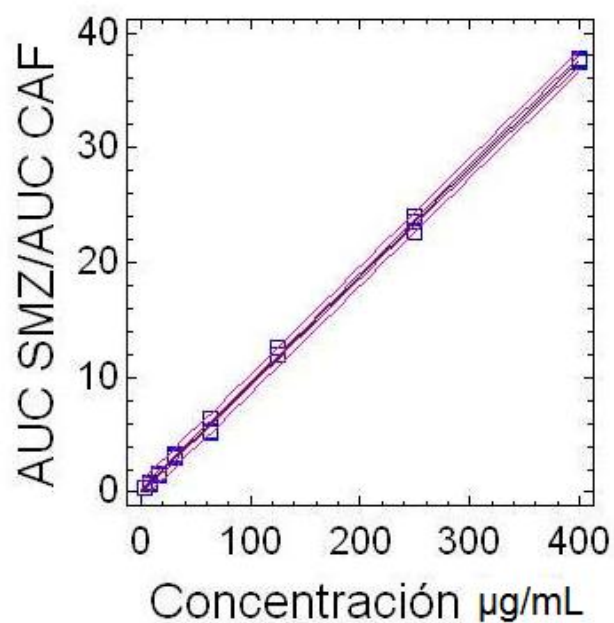


Figura 11.- Gráfica de las curvas de las áreas bajo la curva de sulfametazina corregidas con las áreas bajo la curva del estándar interno. Donde AUC SMZ es área bajo la curva de sulfametazina, AUC CAF es área bajo la curva de cafeína

Parámetros:

Ordenada al Origen (b)	0.0645
Pendiente (m)	0.0938
Coef. de correlación (r)	0.999537
Coef. de relación (r ²)	99.91%
Error std. de estimación (s _{y/x})	0.39058
Límite de detección (LD)	1.26167
Límite de detección (LQ)	4.05508

Tabla 7.- Resultados de los parámetros de la curva de calibración de SMZ obtenidos mediante el análisis de los datos por el programa estadístico STATGRAPHICS XV.

A continuación se muestra el cálculo de la regresión lineal del conjunto de datos de acetilsulfametazina/cafeína, con el mismo software estadístico, también en la tabla se muestran los resultados de los cálculos correspondientes.

Gráfico del Modelo Ajustado

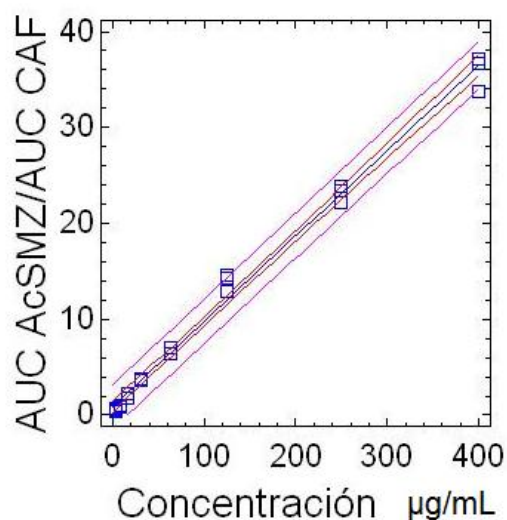


Figura 12.- Gráfica de las curvas de las áreas bajo la curva de acetilsulfametazina corregidas con las áreas bajo la curva del estándar interno. Donde AUC AcSMZ es área bajo la curva de sulfametazina, AUC CAF es área bajo la curva de cafeína

Ordenada al Origen (b)	0.8887
Pendiente (m)	0.0890
Coef. de Correlación (r)	0.9961
Coef. de Relación (r^2)	99.23%
Error std. de estimación ($S_{y/x}$)	1.09098
Límite de Detección (LD)	4.16164
Límite de Cuantificación (LQ)	11.7985

Tabla 8.- Resultados de los parámetros de la curva de calibración de AcSMZ obtenidos mediante el análisis de los datos por el programa estadístico STATGRAPHICS XV.

VI.I.II Selectividad del método

Parámetros cromatográficos que muestran la selectividad y efectividad del método cromatográfico (n=8):

Curva 1

Parámetros	CAF	AcSMZ	SMZ
Tiempo de retención ajustado (t_r') en min	3.01	4.22	5.51
Factor de Capacidad (k)	4.93	6.91	9.03
Factor de Separación (α)	1.40*	1.30**	N/A
Factor de Coleo	1.03	1.03	1.03
Factor de Asimetría	1.03	1.05	1.04

*Con respecto a AcSMZ

**Con respecto a SMZ

Curva 2

Parámetros	CAF	AcSMZ	SMZ
Tiempo de retención ajustado (t_r') en min	3.09	4.5	5.38
Factor de Capacidad (k)	5.06	7.37	9.55
Factor de Separación (α)	1.45*	1.29**	N/A
Factor de Coleo	1.03	1.03	1.02
Factor de Asimetría	1.04	1.05	1.04

*Con respecto a AcSMZ

**Con respecto a SMZ

Curva 3

Parámetros	CAF	AcSMZ	SMZ
Tiempo de retención ajustado (t_r') en min	3.22	4.73	6.06
Factor de Capacidad (k)	5.27	7.75	9.93
Factor de Separación (α)	1.46*	1.28**	N/A
Factor de Coleo	1.03	1.02	1.02
Factor de Asimetría	1.05	1.04	0.96

*Con respecto a AcSMZ

**Con respecto a SMZ

VI.I.III Límite de cuantificación y límite de detección

Parámetros	Sulfametazina	Acetilsulfametazina
Límite de detección (LD)	1.2617 $\mu\text{g/ml}$	4.1616 $\mu\text{g/ml}$
Límite de Cuantificación (LQ)	4.0551 $\mu\text{g/ml}$	11.7985 $\mu\text{g/ml}$

VI.I.IV Precisión

Curva 1

Control	Bajo	Medio	Alto
s SMZ	0.1275	0.1915	2.4278
s AcSMZ	0.0159	0.2106	2.8891

Curva 2

Control	Bajo	Medio	Alto
s SMZ	0.0269	0.2065	0.7559
s AcSMZ	0.0308	0.2257	0.5781

Curva 3

Control	Bajo	Medio	Alto
s SMZ	0.01784	0.0621	1.0822
s AcSMZ	0.0196	0.0837	0.8059

VI.I.V Repetibilidad

Curva 1

Parámetro	SMZ	AcSMZ
Coefficiente de variación de AUC	8.3467	0.9015

Curva 2

Parámetro	SMZ	AcSMZ
Coefficiente de variación de AUC	8.0975	5.2758

Curva 3

Parámetro	SMZ	AcSMZ
Coefficiente de variación de AUC	4.8474	3.0312

VI.I.V Robustez

Parámetros	TR' Cafeína		TR' Sulfametazina		TR' Acetilsulfametazina	
	22%	28%	22%	28%	22%	28%
% de acetonitrilo en la fase móvil	4.7 min	3.6 min	8.47 min	5.19 min	5.99 min	3.99 min
	265 nm	271 nm	265 nm	271 nm	265 nm	271 nm
Variación de la longitud de onda	4.01 min	3.9 min	6.13 min	6.09 min	4.69 min	4.69 min
	4	5	4	5	4	5
Variación de pH del buffer	-----	-----	-----	-----	-----	-----

No fue posible determinar la robustez para el parámetro de variación de pH del buffer debido a que al aumentar o disminuir en 0.5 el pH, el equipo comenzaba a aumentar drásticamente la presión del sistema, lo que no permitía que se completara la corrida de la muestra debido a que el equipo se detenía al alcanzar su límite de presión para la bomba.

A continuación se muestran las gráficas obtenidas de estos experimentos de robustez al tiempo de retención.

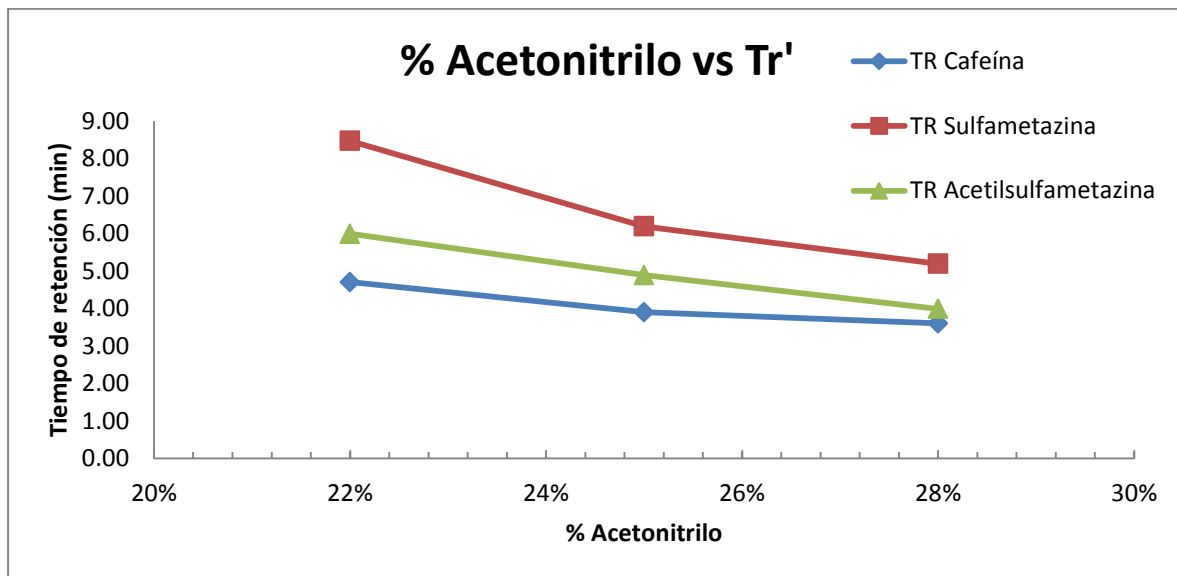


Figura 11.- Gráfico que muestran las variaciones del tiempo de retención ajustado frente las modificaciones del porcentaje de acetonitrilo para probar la robustez del método.

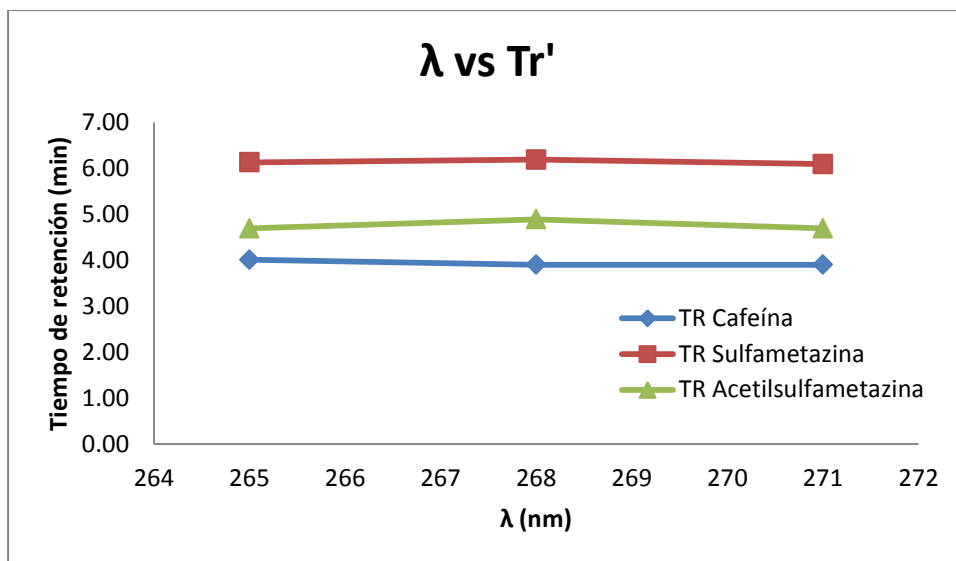


Figura 12.- Gráfico que muestran las variaciones del tiempo de retención ajustado frente las modificaciones de la longitud de onda para probar la robustez del método.

VI.I.VI Estabilidad de las muestras

Al hacer el ensayo de estabilidad de las muestras al inyectarlas al día siguiente de su análisis, al igual que a los 3 días posteriores a su análisis no se observaron cambios en ninguno de sus parámetros. Sin embargo al hacer la inyección de la muestra una semana después de su análisis, no es posible cuantificar a los analitos de interés debido que los picos del cromatograma se observan achatados.

VI.II Resultados obtenidos para análisis de muestras de voluntarios

A continuación se presenta una tabla dónde se muestran los datos obtenidos de concentraciones obtenidas para los voluntarios, así como su índice metabólico, el log del índice metabólico y los probits. La tabla completa se encuentra en el anexo III

	SMZ	AcSMZ			
Voluntario	Conc. µg	Conc. µg	(M)/(F)	Log M/F	Probits
1	144.3883	354.2728	2.4536	0.38981	5.46182
2	119.4949	265.3350	2.2205	0.34645	5.30749
3	133.7016	376.9175	2.8191	0.45011	5.70375
4	300.7028	173.4106	0.5767	-0.23906	4.2194

5	138.6577	317.4457	2.2894	0.35973	5.35313
6	143.2746	204.8891	1.4300	0.15535	4.78427
7	35.9415	256.4420	7.1350	0.85339	8.56063
8	143.8184	231.5212	1.6098	0.20678	4.90327
9	52.7696	122.9350	2.3297	0.36729	5.37977
10	127.3379	152.6290	1.1986	0.07868	4.63108
11	61.2092	127.2281	2.0786	0.31777	5.21357
12	132.5044	58.5473	0.4419	-0.35472	4.13014
13	217.6938	191.3631	0.8790	-0.05599	4.41954
14	208.5740	71.2374	0.3415	-0.46655	4.06375
15	110.0052	317.8163	2.8891	0.46076	5.75009
16	237.1437	32.9506	0.1389	-0.85715	3.92964
17	172.7959	293.3082	1.6974	0.22979	4.96126
18	76.5702	201.5949	2.6328	0.42042	5.58044
19	251.3723	104.6346	0.4163	-0.38064	4.1132
20	223.5526	79.5514	0.3559	-0.44873	4.07322
21	43.1385	89.7033	2.0794	0.31794	5.21413
22	203.6190	78.0868	0.3835	-0.41624	4.09151
23	76.0581	145.9829	1.9194	0.28316	5.10817
24	121.7716	102.5532	0.8422	-0.0746	4.39514
25	61.8849	96.9815	1.5671	0.1951	4.87501
26	80.5677	194.4006	2.4129	0.38254	5.43486
27	207.7672	113.4296	0.5459	-0.26285	4.19905
28	53.2868	108.4930	2.0360	0.30878	5.18539
29	245.6766	69.7845	0.2841	-0.5466	4.02569
30	28.3303	164.7225	5.8144	0.7645	7.68644
31	51.6631	67.9321	1.3149	0.11889	4.70806
32	310.9204	58.6104	0.1885	-0.72467	3.96244
33	97.6283	301.3093	3.0863	0.48944	5.88062
34	109.6568	390.0191	3.5567	0.55105	6.19202
35	250.3152	392.8322	1.5693	0.19572	4.87649
36	560.5773	448.5584	0.8002	-0.09682	4.36733
37	343.8354	93.4321	0.2717	-0.56585	4.01754
38	41.9640	54.0886	1.2889	0.11023	4.69086
39	38.2238	161.0233	4.2126	0.62456	6.6262
40	453.2560	122.1519	0.2695	-0.56944	4.01606

Para la gráfica de frecuencias se obtuvieron los siguientes resultados:

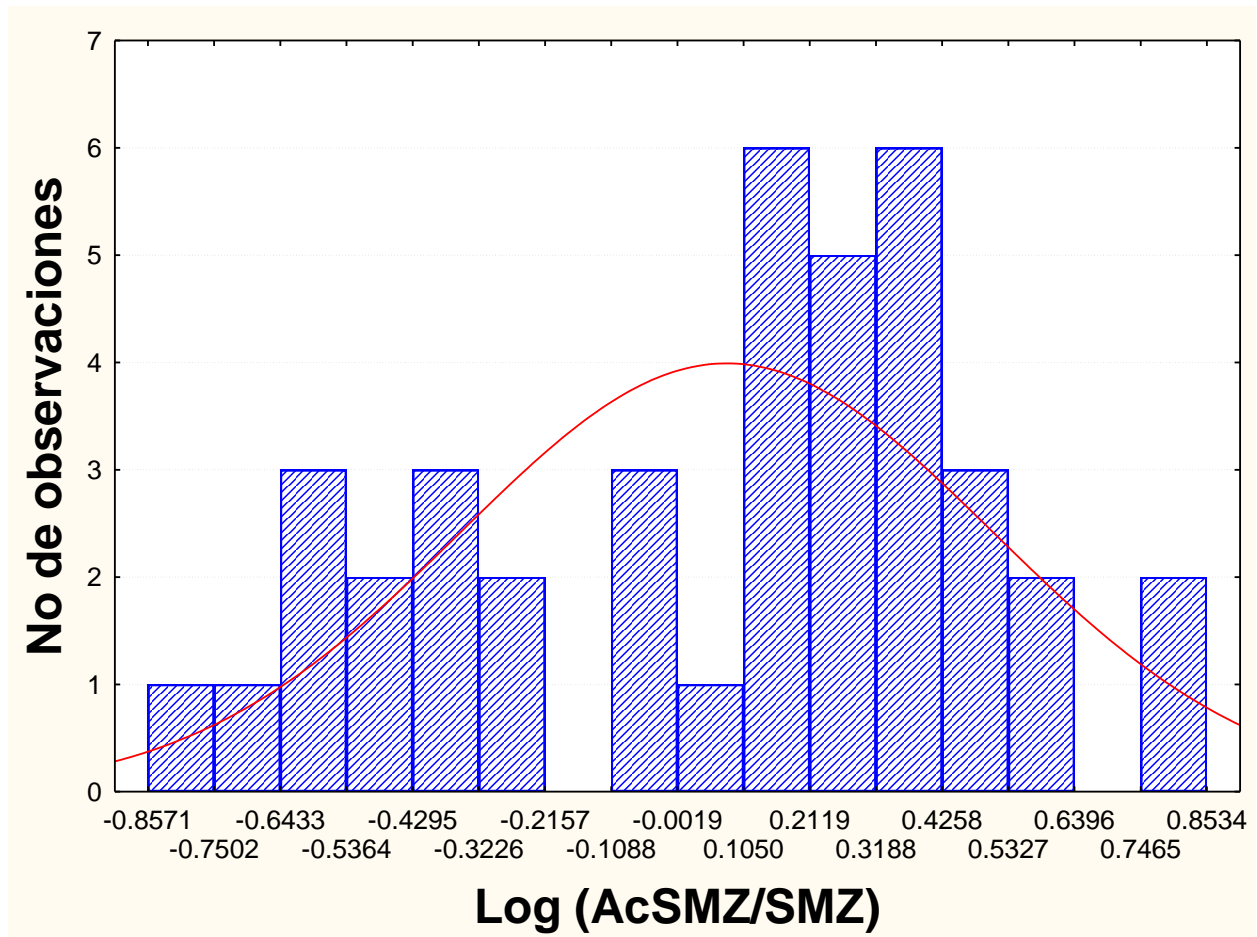


Figura 13.- Gráfica de frecuencia del comportamiento de los voluntarios con respecto al log del índice acetilador, la línea roja expresa el comportamiento de una distribución normal

Los datos obtenidos de la gráfica de probits se representan en la siguiente gráfica.

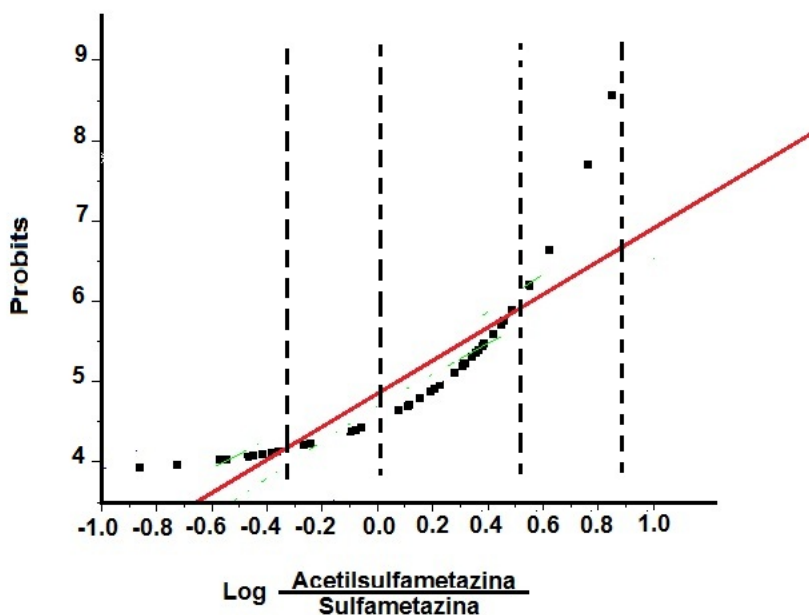


Figura 14.- Gráfica de probits con respecto a su índice metabólico. La línea roja muestra un comportamiento normal, las mismas punteadas señalan los puntos de inflexión para cada uno de los distintos comportamientos.

Los puntos de inflexión en la gráfica de probits, son considerados los puntos de corte de la población, que denotan comportamientos diferentes, podemos observar 4 comportamientos, diferentes y por lo tanto los puntos de corte tentativos son los siguientes:

- -0.9 a -0.1 acetiladores lentos
- -0.1 a 0 acetiladores intermedios
- 0 a 0.5 acetiladores rápidos
- 0.5 0.9 acetiladores ultra rápidos

Los resultados al clasificar a los voluntarios con los puntos de corte anteriores son los siguientes:

Fenotipo Acetilador	No de Voluntarios	%
Lentos	13	32.5
Intermedios	3	7.5
Rápidos	20	50
Ultra rápidos	4	10

Tabla 9.- Clasificación de los voluntarios que se presentaron para la determinación del fenotipo acetilador en el presente estudio. Los datos de porcentaje están dados con respecto a n=40 que corresponde al número de voluntarios

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Desarrollo y validación del método analítico

Se seleccionaron de inicio las condiciones cromatográficas propuestas en el método desarrollado por Villascan Rodríguez, 2015, con éstas condiciones se obtuvieron los primeros cromatogramas y a partir de ellos se comenzaron a hacer modificaciones para lograr la adecuada separación de los analitos de interés. La principal diferencia en el montaje del método fue el tipo de columna, el método de Villascan Rodríguez, 2015, así como la bibliografía consultada donde se proponen métodos cromatográficos utilizan una columna de fase reversa C18, y la que se utilizó para desarrollar el presente trabajo es una columna de fase reversa C8 de marca LiChrosphere 100.

Debido a esto las modificaciones que se efectuaron fueron hechas con respecto a la composición de la fase móvil, que es uno de los factores principales que afectan el factor de separación de los analitos en la técnica de HPLC.

Cuando se hicieron las modificaciones, se cambió el solvente orgánico metanol, por acetonitrilo, manteniendo al buffer en la misma concentración y valor de pH, con el objeto de mejorar la resolución y/o separación de los analitos de interés (sulfametazina y acetilsulfametazina).

Con el fin de minimizar las interferencias que se pueden presentar al analizar las muestras, siempre se procede a un tratamiento de la matriz biológica. Sin embargo los procesos reportados en la bibliografía son muy complejos y un mínimo error puede provocar pérdida de nuestros analitos de interés.

Al hacer los cambios en las condiciones cromatográficas además de encontrar las condiciones adecuadas de separación de los analitos, se pretendía encontrar la manera de hacer lo más simple posible el tratamiento de la matriz biológica.

De los cromatogramas que se obtuvieron al inyectar la matriz biológica sola y la matriz biológica cargada con los analitos de interés, es importante mencionar

que a la matriz biológica se le tuvo que hacer un tratamiento previo a su inyección, en este caso una dilución debido a que ciertas sustancias propias de la matriz biológica (interferencias) impiden la adecuada cuantificación de sulfametazina y acetilsulfametazina.

Al llevar a cabo los análisis estadísticos aplicados a ambas curvas de calibración del método desarrollado para determinar sulfametazina y acetilsulfametazina, es posible observar que no existen diferencias significativas en los parámetros estadísticos que pudieran invalidar el proceso.

Para las condiciones del presente método, a diferencia de los reportados en la bibliografía, no es necesaria una extracción, o serie de extracciones con solvente orgánico a las muestras, simplemente basta con una dilución de la muestra con la fase móvil a utilizar.

Es posible mencionar que el método desarrollado cumple con los requisitos de linealidad, selectividad, repetibilidad y robustez. Con respecto a los parámetros cromatográficos se observa que los valores de factor de capacidad (k), separación (α), factor de retención (T_R) y asimetría (A_s) se encuentran dentro de lo aceptable reportado en la bibliografía. (Ver tablas 7 y 8)

Es importante mencionar que en la prueba de robustez, el método cromatográfico es muy susceptible a cambios de pH por lo que se debe tener especial cuidado con ésta condición.

Fenotipo acetilador

La gráfica de frecuencia con respecto al índice metabólico, permitió observar que la distribución de la capacidad acetiladora no es representado por una curva de distribución normal, un análisis alternativo es determinar el valor de asimetría de los datos, este valor fue de 0.428385, se propone que un valor diferente a cero, significa que el comportamiento de la población considerada no es representado por la curva de distribución normal.

Aun cuando no sigue un comportamiento normal, no es posible reconocer con cierta precisión, si el comportamiento es bimodal, o polimodal, por esta razón se efectúa el análisis por probits, si la distribución es normal obtenemos una línea recta, si la distribución no es normal, se considera que cada punto de inflexión representa un comportamiento particular de algunos miembros de la población total, en nuestro caso en la figura observamos 4 tipos de comportamientos diferentes, en la tabla se presentan los porcentajes por cada subpoblación.

El porcentaje de acetiladores lentos es de 37.5%, siendo parecido al fenotipo acetilador que se ha observado en poblaciones chinas. (Ver Tabla 9 y Figuras 11 y 12)

VIII. CONCLUSIÓN

En cuánto a nuestro método montado por HPLC podemos concluir que las condiciones son adecuadas para la cuantificación de los analitos de interés en muestras de orina humana y que cumple los criterios de validación, lo cual permite evaluar el fenotipo acetilador en muestras de orina en la población de interés.

Con respecto al fenotipo acetilador, podemos concluir que la hipótesis propuesta es acertada debido a que, de acuerdo a los resultados obtenidos se observaron diferencias entre el fenotipo acetilador de la población europea con respecto a la población evaluada en éste estudio (mexicanos). El fenotipo acetilador en la población mexicana es prevalentemente rápido y más parecido al que se ha observado en poblaciones asiáticas, principalmente en chinos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Cabaleiro, T. & Abad-Santos, F.: Farmacogenética: Presente y futuro. Actualidad en Farmacología y Terapéutica, 2011; 9: 13-19.
2. Lang, N.P.: Acetylation as an Indicator of Risk, Environmental Health Perspectives, 1997; 105: 763-766
3. Gran, D.M., Tang, B.K., & Kalow W.: A simple test for acetylation phenotype using caffeine, British Journal of Clinical Pharmacology, 1984; 17: 459-464
4. Payton, M. & Sim, E.: Genotyping Human ArylamineN-Acetyltransferase Type 1(NAT1), Biochemical Pharmacology, 1998; 55: 361-366
5. Sim, E., Lack, N., Wang, C., Long, H., Westwood, I., Fullam, E., et al.: ArylamineN-acetyltransferases: Structural an functional implications of polymorphisms, Toxicology, 2008; 254: 170-18
6. Gross, M., Kruisselbrink, T., Anderson, K., Lang, N., Mc Govern, P., Delongchamp, R., et al.: Distribution and Concordance of N-Acetyltransferase Genotype and Phenotype in American Population, Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 1999; 8: 683-692
7. García, M. J. M.: Polimorfismo NAT2 y Patología Humana, Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura. Facultad de Medicina; Cáceres, España, 2001
8. Philip, P.A., Roberts, M.S. & Rogers, H.J.: A rapid method for determination of acetylation phenotype using dapsone, British Journal of Clinical Pharmacology, 1984; 17: 465-469
9. El-Yazigi, A., Chaleby, K. & Martin, C.R.: A Simplified and Rapid Test for AcetylatorPhenotyping by Use of the Peak High Ratio of Two Urinary Caffeine Metabolites, Clinical Chemistry, 1989; 35: 848-851

10. Karim, A.K.M.B., Elfellah, M.S. & Evans, D.A.P.: Human acetylator polymorphism estimate of allele frequency in Libya and details of global distribution, *Journal of Medical Genetics*, 1981; 18: 325-330
11. Rychlik-Sych, M., Skrętkowicz, J., Gawrońska-Szklarz, B., Górnik, W., Sysa-Jędrzejowska, A. & Skrętkowicz-Szarmach, K.: Acetylation genotype and phenotype in patients with systemic lupus erythematosus, *Pharmacological Reports*, 2006; 58: 22-29
12. Chen, B., Cai, W., Li, J. & Cao, X.: Estimating N-acetyltransferase metabolic activity and pharmacokinetic parameters of isoniazid from genotypes in Chinese subjects. *Clinica Chimica Acta*, 2009; 405: 23-29
13. Makarova, S.I.: Human N-Acetyltransferases and Drug-Induced Hepatotoxicity, *Current Drug Metabolism*, 2008; 9: 538-545
14. Hughes, H.B., Schmidt, L.H., Biehl, J.P.: The metabolism of isoniazid, its implications in therapeutic use, *Trans 14th Conference Chemoterapeutic for Tuberculosis*, 1955; 217-222
15. Mitchell, R.S., Bell, J.C.: Clinical implications of isoniazid, Pas and streptomycin blood levels in pulmonary tuberculosis. *Trans Am ClinClim Ass*, 1957; 69: 98-105
16. Evans, D.A.P., *Pharmacogenetique. Med Hyg*, 1962; 20: 905-908
17. Sinués, B., Pérez, J., Bernal, M.L., Saénz, M.A., Lanuza, J. & Bartolomé, M.: Urinary Mutagenicity and N-Acetylation Phenotype in Textile Industry Workers Exposed to Arylamines, *Cancer Research*, 1992; 52: 4885-4889
18. Kita, T., Tanigawara, Y., Chikazawa, S., Hatanaka, H., Sakaeda, F., Komada, F., et al.: N-acetyltransferase2 Genotype Correlated with Isoniazid Acetylation in Japanese Tuberculous Patients, *Biological Pharmacy Bulletin*, 2001; 24(5): 544-549
19. Rao, K.V.N., Mitchincosn, D.A., Nair, N.G.K, Prema, K. & Tripathy, S.P.: Sulphamidine Acetilation Test for Classification of Patients as Slow or Rapid Inactivators of Isoniazid, *Brittish Medical Journal*, 1970; 3: 495-497

20. Ellard, G.A. & Gammon, P.T.: Acetylatorphenotyping of tuberculosis patients using matrix isoniazid or sulphadimidine and its prognostic significance for treatment with several intermittent isoniazid-containing regimens, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1977; 3: 5-14
21. Quattrocchi, O. A., Abelaira de Andrizzi, S.I., Laba, R.F.: Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica, Ed. Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, Argentina, 1992
22. Milena, G., Ramírez G., Velásquez O., Pérez M. & Restrepo, P.: Validation of analytical method for determination of glimepiride in human plasma by HPLC/UV with addition standard using glibenclamide as an internal standard, *Ars Pharmaceutica*, 2005; 46: 411-427
23. Pérez, M., Ramírez, G., Pérez, M. & Restrepo, P.: Validación del método analítico para la determinación de valsartán en plasma humano por HPLC/UV con adición de estándar empleando losartán como estándar interno, *Colombia Médica*, 2007; 38: 13-20
24. Meriño, E.L., Albert, V., Ferrer, M.M.S., Modamio, P. & Lastra, C.F.: Desarrollo y Validación de métodos analíticos para la cuantificación de antirretrovirales por HPLC, *Farmacia Hospitalaria*, 2006; 30: 374-378
25. Contreras, R.J., Jardines, L.Y., Fonseca, M. & Águila, B.: Validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación del principio activo en tabletas de Controfilina-200, *CENIC Ciencias Químicas*, 2005; 36: 74-78
26. Trejos, C.N. & Tello, M.F.: Validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de sulfadiazina de plata en crema, *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 2008; 37:191-199
27. Rico, J., Merchán, Y., Cuevas, M. & Márquez, J.: Validación de un método de determinación del polisacárido B residual en vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis*, *VacciMonitor*, 2010; 19: 18-23

28. Modamio, C. P., Lastra, F. C., Papiol, O. C. & Mariño, E.L., Validación de un método analítico de HPLC para la determinación de permetrina y estudios de estabilidad, *Tecnología Farmacéutica*, 2008; 20: 315-316
29. Esquivel, S.E.E. & Leal, G.L.I.: *Cromatografía de Fase Reversa*, Trabajo de Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología; Cuernavaca, Morelos, 2004
30. Villascán, R.A.: *Desarrollo y Validación de un método analítico para determinar sulfametazina y acetilsulfametazina por HPLC*, Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Químicas; Puebla de Zaragoza, 2015

X. ANEXOS

Anexo I.- Acta de Consentimiento

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética

ACTA DE CONSENTIMIENTO

El (La) que suscribe _____ de _____ años de edad, en pleno uso de mis facultades físicas y mentales, declaro haber sido invitado a participar como sujeto experimental en el proyecto **EVALUACIÓN PREELIMINAR DEL FENOTIPO ACETILADOR DE SULFAMETAZINA Y ACETILSULFAMETAZINA EN ORINA, EMPLEANDO UN MÉTODO POR HPLC.**

Para este fin he sido informado (a) en forma amplia y clara que recibiré 500 mg de Sulfametazina en forma de cápsulas de gelatina dura de 250 mg cada una. Así mismo recolectaré una muestra antes de ingerir el fármaco (22:00 hrs. aproximadamente) y entregaré ambas muestras (blanco y muestra) al día siguiente. Todo ello es con el propósito de realizar el presente estudio y que el único fin es el de colaborar con la determinación de la capacidad acetiladora. Además que se me ha informado que los riesgos de esta administración pueden consistir en náuseas, vómitos y/o diarrea.

Así mismo he informado que no padecí ninguna enfermedad que dañe el hígado, no tengo enfermedades crónicas, no estoy en tratamiento con fármacos, y tampoco presento hipersensibilidad a las sulfas. Al participar en este estudio me comprometo a no ingerir bebidas alcohólicas, ni consumir chocolate, café, ni ningún otro alimento y/o bebida que contenga cafeína.

Por lo anterior expreso libremente y sin ningún tipo de coerción mi buena y sana voluntad de cooperación para el desarrollo del presente trabajo.

Por último es conveniente mencionar, que puedo retirarme en cualquier momento si así lo considero prudente.

H. Puebla de Z a de del 20

Firma del Voluntario

Firma del Profesor

Firma del Testigo

Firma del Testigo

Anexo II.- Ejemplos de Actas de Consentimiento Firmadas

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética

ACTA DE CONSENTIMIENTO

El (La) que suscribe _____ de _____ años de edad, en pleno uso de mis facultades físicas y mentales, declaro haber sido invitado a participar como sujeto experimental en el proyecto **EVALUACIÓN PREELIMINAR DEL FENOTIPO ACETILADOR DE SULFAMETAZINA Y ACETILSULFAMETAZINA EN ORINA, EMPLEANDO UN MÉTODO POR HPLC.**

Para este fin he sido informado (a) en forma amplia y clara que recibiré 500 mg de Sulfametazina en forma de cápsulas de gelatina dura de 250 mg cada una. Así mismo recolectaré una muestra antes de ingerir el fármaco (22:00 hrs. aproximadamente) y entregaré ambas muestras (blanco y muestra) al día siguiente. Todo ello es con el propósito de realizar el presente estudio y que el único fin es el de colaborar con la determinación de la capacidad acetiladora. Además que se me ha informado que los riesgos de esta administración pueden consistir en náuseas, vómitos y/o diarrea.

Así mismo he informado que no padecí ninguna enfermedad que dañe el hígado, no tengo enfermedades crónicas, no estoy en tratamiento con fármacos, y tampoco presento hipersensibilidad a las sulfas. Al participar en este estudio me comprometo a no ingerir bebidas alcohólicas, ni consumir chocolate, café, ni ningún otro alimento y/o bebida que contenga cafeína.

Por lo anterior expreso libremente y sin ningún tipo de coerción mi buena y sana voluntad de cooperación para el desarrollo del presente trabajo.

Por último es conveniente mencionar, que puedo retirarme en cualquier momento si así lo considero prudente.

H. Puebla de Z a de del 20

Firma del Voluntario

Firma del Profesor

Firma del Testigo

Firma del Testigo

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética

ACTA DE CONSENTIMIENTO

El (La) que suscribe _____ de _____ años de edad, en pleno uso de mis facultades físicas y mentales, declaro haber sido invitado a participar como sujeto experimental en el proyecto **EVALUACIÓN PREELIMINAR DEL FENOTIPO ACETILADOR DE SULFAMETAZINA Y ACETILSULFAMETAZINA EN ORINA, EMPLEANDO UN MÉTODO POR HPLC.**

Para este fin he sido informado (a) en forma amplia y clara que recibiré 500 mg de Sulfametazina en forma de cápsulas de gelatina dura de 250 mg cada una. Así mismo recolectaré una muestra antes de ingerir el fármaco (22:00 hrs. aproximadamente) y entregaré ambas muestras (blanco y muestra) al día siguiente. Todo ello es con el propósito de realizar el presente estudio y que el único fin es el de colaborar con la determinación de la capacidad acetiladora. Además que se me ha informado que los riesgos de esta administración pueden consistir en náuseas, vómitos y/o diarrea.

Así mismo he informado que no padecí ninguna enfermedad que dañe el hígado, ni renal, no tengo enfermedades crónicas, no estoy en tratamiento con fármacos, y tampoco presento hipersensibilidad a las sulfas. Al participar en este estudio me comprometo a no ingerir bebidas alcohólicas, ni consumir chocolate, café, ni ningún otro alimento y/o bebida que contenga cafeína.

Por lo anterior expreso libremente y sin ningún tipo de coerción mi buena y sana voluntad de cooperación para el desarrollo del presente trabajo.

Por último es conveniente mencionar, que puedo retirarme en cualquier momento si así lo considero prudente.

H. Puebla de Z a de del 20

Firma del Voluntario

Firma del Profesor

Firma del Testigo

Firma del Testigo

Anexo III.- Tabla de los resultados obtenidos al analizar las muestras de voluntarios sanos

						SMZ	AcSMZ			
Voluntario	AUC SMZ	AUC AcSMZ	AUC CAF	AUC SMZ/AUC CAF	AUC AcSMZ/AUC CAF	Conc. µg	Conc. µg	[M]/[F]	Log M/F	Probits
1	245	7546	239	1,0251	31,5732	144,3883	354,2728	2,4536	0,389805748	5,4618175
2	217	5941	251	0,8645	23,6693	119,4949	265,3350	2,2205	0,346445347	5,3074924
3	240	8430	251	0,9562	33,5857	133,7016	376,9175	2,8191	0,450109697	5,7037475
4	610	4650	300	2,0333	15,5000	300,7028	173,4106	0,5767	-0,239061893	4,2193955
5	250	7160	253	0,9881	28,3004	138,6577	317,4457	2,2894	0,359725332	5,3531315
6	284	5105	279	1,0179	18,2975	143,2746	204,8891	1,4300	0,155349583	4,7842729
7	91,5	6429	281	0,3256	22,8790	35,9415	256,4420	7,1350	0,853392826	8,5606259
8	286	5786	280	1,0214	20,6643	143,8184	231,5212	1,6098	0,206776292	4,9032718
9	122	3095	281	0,4342	11,0142	52,7696	122,9350	2,3297	0,367292079	5,379767
10	248	3700	271	0,9151	13,6531	127,3379	152,6290	1,1986	0,07867945	4,6310788
11	150	3498,5	307	0,4886	11,3958	61,2092	127,2281	2,0786	0,317766491	5,2135667
12	276	1540	291	0,9485	5,2921	132,5044	58,5473	0,4419	-0,354723739	4,1301436
13	361	4120	241	1,4979	17,0954	217,6938	191,3631	0,8790	-0,055988033	4,4195428
14	449	2003	312	1,4391	6,4199	208,5740	71,2374	0,3415	-0,466551917	4,0637464

15	241	8500	300	0,8033	28,3333	110,0052	317,8163	2,8891	0,46076306	5,7500892
16	375	697	231	1,6234	3,0173	237,1437	32,9506	0,1389	-0,85714876	3,929638
17	319	6905	264	1,2083	26,1553	172,7959	293,3082	1,6974	0,229790912	4,9612648
18	124	3799	211	0,5877	18,0047	76,5702	201,5949	2,6328	0,420419831	5,5804385
19	566	3098	330	1,7152	9,3879	251,3723	104,6346	0,4163	-0,380642061	4,1131992
20	387	1804	252	1,5357	7,1587	223,5526	79,5514	0,3559	-0,448732072	4,0732159
21	103,8	2249	279	0,3720	8,0609	43,1385	89,7033	2,0794	0,317943851	5,2141288
22	394	1968	280	1,4071	7,0286	203,6190	78,0868	0,3835	-0,416240932	4,0915145
23	187	4180	320	0,5844	13,0625	76,0581	145,9829	1,9194	0,283156278	5,1081722
24	182	1905	207	0,8792	9,2029	121,7716	102,5532	0,8422	-0,074597131	4,3951364
25	140	2473	284	0,4930	8,7077	61,8849	96,9815	1,5671	0,195104078	4,8750136
26	159,5	4515	260	0,6135	17,3654	80,5677	194,4006	2,4129	0,382536824	5,4348597
27	423	3000	295	1,4339	10,1695	207,7672	113,4296	0,5459	-0,262850415	4,1990484
28	91	2024	208	0,4375	9,7308	53,2868	108,4930	2,0360	0,308781735	5,1853942
29	381	1428	227	1,6784	6,2907	245,6766	69,7845	0,2841	-0,546604802	4,0256879
30	81,3	4330	294	0,2765	14,7279	28,3303	164,7225	5,8144	0,764501407	7,6864431
31	94,8	1360	222	0,4270	6,1261	51,6631	67,9321	1,3149	0,118894565	4,7080572
32	550	1388	262	2,0992	5,2977	310,9204	58,6104	0,1885	-0,724674239	3,9624431

33	157	5830	217	0,7235	26,8664	97,6283	301,3093	3,0863	0,489437	5,8806172
34	1720	8340	240	7,1667	34,7500	109,6568	390,0191	3,5567	0,551050152	6,1920172
35	410	8400	240	1,7083	35,0000	250,3152	392,8322	1,5693	0,195719808	4,8764854
36	779	8390	210	3,7095	39,9524	560,5773	448,5584	0,8002	-0,096816585	4,3673321
37	601	2182	260	2,3115	8,3923	343,8354	93,4321	0,2717	-0,565854662	4,0175358
38	141	2154	222	0,6351	9,7027	41,9640	54,0886	1,2889	0,110229006	4,6908622
39	79,3	3355	233	0,3403	14,3991	38,2238	161,0233	4,2126	0,624555178	6,6262028
40	872	3163	289	3,0173	10,9446	453,2560	122,1519	0,2695	-0,569443418	4,0160556

Anexo IV. Material ocupado para la cuantificación del sulfametazina y acetilsulfametazina en orina humana

INSTRUMENTOS Y SOFTWARE

INSTRUMENTO O SOFTWARE	MARCA	VERSION
HPLC VARIAN	VARIAN	PROSTAR 210
UV DETECTOR	JASCO	V-530
SOFTWARE ESTADISTICO STATGRAPHICS	STATGRAPHICS	CENTURION XV

SOLVENTES

SOLVENTE	GRADO	MARCA	LOTE
Metanol	Analítico	Química Meyer	B0908860
Acetonitrilo	HPLC	Fermont	H13C52
Metanol	HPLC	Fermont	CY496

REACTIVOS

REACTIVO	MARCA	LOTE
Fosfato monobásico de potasio	J. T. Baker	X06C14
Hidróxido de Sodio	J. T. Baker	9721-03
Acido Clorhídrico	Golden Bell	2M01368
Acido Fosfórico	Omnichem	220216

EQUIPO

EQUIPO	MARCA	MODELO
Pipeta automática 1000μL	Jencons Sealpette	CT48339
Pipeta automática 100 μL	Jencons Sealpette	ES28013
Balanza Analítica	Startorius	BP1218
pH metro	Corning	430
Bomba de Vacío	Welch	1400
Parrilla Eléctrica	Thermolyne	SP46925
Centrifuga	SolBat	J-500
Sonicador	Branson	2510