



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la biodistribución en ratas de una cumarina libre y microencapsulada

Aura Rocío Hernández Camargo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia

Bogotá, Colombia

2013

Evaluación de la biodistribución en ratas de una cumarina libre y microencapsulada

Aura Rocío Hernández Camargo, Q.F.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Ph.D., Diana Marcela Aragón Novoa

Grupos de Investigación:

Principios Bioactivos de Plantas Medicinales

Sistemas de Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas (SILICOMOBA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia

Bogotá, Colombia

2013

A mi mamá por su apoyo incondicional y ayuda incansable.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, por permitir mi formación en su claustro, por todo lo que me ha dado, por todo lo que he crecido en ella.

A la Vicerrectoría de Investigación por la financiación del Proyecto de Investigación “Implementación de un bioensayo para el estudio de la biodistribución de principios bioactivos de plantas desde formas farmacéuticas microparticuladas”

Al Departamento de Farmacia por permitir sus instalaciones y equipos para el desarrollo de este trabajo.

A COLCIENCIAS, por el apoyo mediante el programa “Jóvenes Investigadores e Innovadores Virginia Gutiérrez de Pineda”.

A Dios, por cada minuto de mi vida, por permitirme llevar a cabo todos mis sueños, por darme la oportunidad de ser.

A mi madre, por ser la mujer que es, por su ejemplo, su talante, por su incondicionalidad y porque sin ella nada habría sido posible.

A Daniel Mauricio, por todo su apoyo, por sus regaños, por su complicidad, por su compañía, por su amor.

A la profesora Marcela Aragón, por sus enseñanzas, por su gran ayuda, por su apoyo constante, por creer en mí, por los viajes, por su amistad.

Al profesor Luis Fernando Ospina, por toda su ayuda, por sus enseñanzas, por sus chistes flojos y los buenos también, por creer en mí siempre.

A mis amigas del mejor equipo del mundo por su apoyo, compañía y por todos los momentos vividos en este largo proceso.

A Paola Cárdenas, por su valiosa ayuda, por tantos ensayos, por tantas muestras, por tanto material que lavar, por su compañía, por su amistad.

A Jimena Zuluaga por su incondicional ayuda en los ensayos con los animales, por su aliento, por su amistad.

A Alejandro Lara, por tantos favores, por tantas sonrisas, por su amistad.

A Marcel Berrío, por su incondicional apoyo, por su ayuda con el manejo del cromatógrafo.

A los profesores del Departamento de Farmacia que de una u otra manera permitieron llevar a cabo este trabajo, al profesor Javier García, al profesor Jaime Rojas.

A Gabriela, por ser siempre una voz de aliento, porque a pesar de la distancia siempre estuvo cerca, por los postres, los “cocktails”, por las confesiones, por ser parquera.

Y a todas las personas que conocí durante este tiempo que con su presencia hicieron parte de este logro, por las alegrías, por las tristezas, por las enseñanzas...

GRACIAS!

.

Resumen

Los estudios de biodistribución desarrollados hasta ahora en diferentes lugares y grupos de investigación a nivel mundial, se han efectuado con el fin de encontrar herramientas principalmente en tecnología farmacéutica, que permitan el direccionamiento de fármacos a sitios especiales; en su mayoría a órganos diana de difícil acceso o incluso para el tratamiento de algunos tumores localizados. Particularmente, en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia no se han realizado estudios de este tipo por lo que el trabajo desarrollado pretendió ahondar en este campo e implementar bioensayos en este sentido.

El estudio de biodistribución realizado en ese trabajo fue llevado a cabo en ratas Wistar y como molécula de estudio la 6 - metilcumarina (6MC) por su interesante actividad antiinflamatoria. Para su realización, el trabajo se dividió en tres etapas: la primera enfocada al desarrollo de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) para identificar y/o cuantificar 6MC en las diferentes muestras biológicas; la segunda orientada a la evaluación *in vivo* de biodistribución de 6MC administrada en una forma libre y microencapsulada; y una tercera parte en la cual se evaluó y comparó la actividad antiinflamatoria de 6MC libre y microencapsulada.

Como resultados se logró desarrollar y validar una técnica analítica que permitió la cuantificación de 6MC en el modelo murino. Se logró identificar el perfil de biodistribución de dicho compuesto en el modelo animal encontrando como principales órganos de acumulación el hígado, bazo, corazón, riñones y la extremidad manteniendo el mismo perfil desde ambas formas administradas (libre y microencapsulada). Se demostró que el sistema microparticulado mejora la entrega de 6MC haciéndolo de manera más controlada, con mejor uniformidad de dosis y sostenida en el tiempo. Finalmente se demostró que, frente a la forma libre, la actividad antiinflamatoria de 6MC aumenta considerablemente cuando es administrada en el sistema de entrega microparticulado.

Palabras clave: Biodistribución, 6 - metilcumarina, micropartículas, inflamación.

Abstract

Biodistribution studies have been developed at different places and research groups around the world, in order to find tools in pharmaceutical technology mainly, to enable drug targeting to special anatomic sites, mainly to inaccessible target organs. Particularly in the Department of Pharmacy of National University of Colombia there has not been that kind of studies, so this work wants to deep en in the biodistribution field and implement bioassays.

Biodistribution study made in this work was carried out in Wistar rats and 6 - methylcoumarin (6MC) as study compound which has interesting anti-inflammatory activity. For this evaluation, the study was divided into three stages: the first focused on the development of an High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analytical technique to identify and / or quantify 6MC in different biological samples; the second one oriented to the evaluation of the *in vivo* biodistribution of free and microencapsulated 6MC; and a third part in which was evaluated and compared the antiinflammatory activity of free and microencapsulated 6MC.

As results, it was able to develop and validated an analytical technique that allowed the quantification of 6MC in the murine model. It was identified the 6MC biodistribution profile in the animal model finding as main storage organs liver, spleen, heart, kidneys and paw; this profile was similar for administered free and microencapsulated 6MC. It was demonstrated that the microparticle system improves 6MC delivery making a more controlled way, with greater dose uniformity and sustained delivery over time. Finally, it was shown that the anti-inflammatory activity increases considerably 6MC when it is administered in the microparticle delivery system.

Keywords: Bidistribution, 6-methylcoumarin, microparticles, inflammation

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Abstract	XII
Lista de figuras	XVII
Lista de ecuaciones	XVIII
Lista de gráficos	XIX
Lista de tablas	XX
Lista de símbolos y abreviaturas	XXII
Introducción	1
1. Marco teórico	3
1.1 Biodistribución	3
1.1.1 Algunos estudios previos sobre biodistribución	5
1.2 Microesferas	8
1.3 Actividad biológica de cumarinas	10
1.4 Metodología analítica.....	14
1.4.1 Selectividad y especificidad.....	15
1.4.2 Linealidad.....	15
1.4.3 Precisión y Exactitud.....	18
1.4.4 Límite de cuantificación.....	19
1.4.5 Estabilidad	19
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo general.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Materiales y métodos	23
3.1 Materiales	23
3.1.1 Reactivos	23
3.1.2 Animales de experimentación	23
3.1.3 Consideraciones éticas	24
3.1.4 Micropartículas.....	24
3.2 Metodología.....	25
3.2.1 Desarrollo del método analítico por CLAE	25

3.2.1.1	Condiciones cromatográficas	25
3.2.1.2	Método cromatográfico.....	26
3.2.1.3	Preparación de las muestras.....	26
3.2.1.4	Método de extracción	27
3.2.1.5	Idoneidad del sistema	28
3.2.2	Validación de la metodología analítica	28
3.2.2.1	Linealidad.....	29
3.2.2.2	Especificidad y selectividad.....	29
3.2.2.3	Límite de cuantificación.....	29
3.2.2.4	Precisión	30
3.2.2.5	Exactitud	30
3.2.2.6	Estabilidad de las muestras.....	31
3.2.3	Estudio de biodistribución	31
3.2.4	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de 6MC libre y 6MC – MP.....	32
3.2.5	Análisis estadístico.....	33
4.	Resultados y discusión	34
4.1	Análisis previo de 6MC	34
4.2	Desarrollo del método cromatográfico	35
4.3	Validación de la metodología.....	38
4.3.1	Idoneidad del sistema	38
4.3.2	Parámetros de validación.....	42
4.4	Evaluación de la biodistribución de 6MC	70
4.5	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de 6MC – MP	80
5.	Conclusiones y Recomendaciones.....	85
5.1	Conclusiones	85
5.2	Recomendaciones	86
	Bibliografía	87

Lista de figuras

Figura1-1: Imagen de fluorescencia de la biodistribución <i>in vivo</i> de paclitaxel cargado en nanopartículas de policaprolactona pegilada.....	4
Figura1-2: Evaluación de la biodistribución de nanopartículas radiomarcadas.....	4
Figura 1-3: Estructura de 6-metilcumarina.....	14
Figura 3-1: Esquema gráfico de las condiciones experimentales para el desarrollo de la metodología analítica.....	26
FIGURA 3-2: Pletismómetro Ugo Basile® de desplazamiento de agua.....	33
Figura4-1: Espectro de absorción para una solución de 6MC 10 µg/mL en barrido espectrofotométrico entre 250 y 350 nm.....	35
Figura 4-2: Cromatograma obtenido para la identificación de 6MC en plasma.....	38
Figura 4-3: Estructura química de cumarinas relacionadas y utilizadas en la validación del método.....	38
Figura 4-4: Cromatogramas de la evaluación de especificidad del método frente a los componentes endógenos de la matriz.....	44
Figura 4-5: Evaluación de la selectividad del método frente a otros compuestos similares.....	44
Figura 4-6: Cromatogramas de la evaluación de especificidad del método frente a componentes endógenos de la matriz en muestras enriquecidas con 6MC.....	45
Figura 4-7: Cromatograma de muestra de plasma en el estudio de biodistribución.....	71

Lista de ecuaciones

Ecuación 1-1: Desviación estándar del intercepto.	16
Ecuación1-2: Desviación estándar de la pendiente.	16
Ecuación1-3: Varianza del error experimental total.	16
Ecuación1-4: Desviación estándar de la linealidad.....	17
Ecuación1-5: Desviación estándar de la regresión.....	17
Ecuación1-6: Suma de cuadrados para la regresión.	18
Ecuación1-7: Suma de cuadrados del error puro.....	18
Ecuación1-8: Suma de cuadrados entre concentraciones	18
Ecuación1-9: Suma de cuadrados para el desvío de la linealidad:	18
Ecuación3-1: Desviación estándar relativa expresada en porcentaje.	30
Ecuación3-2: Error absoluto	31
Ecuación3-3: Error relativo expresado en porcentaje	31
Ecuación3-4: Porcentaje de inhibición del edema.	33
Ecuación 4-1: Factor de capacidad (k)	39
Ecuación 4-2: Determinación del factor de separación	40
Ecuación 4-3: Número de platos teóricos (n).....	40
Ecuación 4-4: Altura equivalente de plato teórico (H)	41
Ecuación 4-5: Resolución (R)	41
Ecuación 4-6: Factor de asimetría (T)	42

Lista de gráficos

Gráfico 4-1: Gradiente de elución de la fase móvil B para el desarrollo del método de cuantificación de 6MC.	36
Gráfico 4-2: Curvas de calibración para 6MC en el sistema (metanol – agua).....	48
Gráfico 4-3: Curva de calibración para 6MC en el método 1: hígado.....	50
Gráfico 4-4: Curva de calibración para 6MC en el método 2: pulmones.	52
Gráfico 4-5: Curva de calibración para 6MC en el método 3: bazo.	54
Gráfico 4-6: Curva de calibración para 6MC en el método 4: corazón.	56
Gráfico 4-7: Curva de calibración para 6MC en el método 5: extremidad.	58
Gráfico 4-8: Curva de calibración para 6MC en el método 6: riñones.	60
Gráfico 4-9: Curva de calibración para 6MC en el método 7: plasma.	62
Gráfico 4-10: Evaluación de la Biodistribución de 6MC– libre en ratas Wistar.	73
Gráfico 4-11: Evaluación de la Biodistribución de 6MC - MP en ratas Wistar.	74
Gráfico 4-12: Biodistribución de 6MC libre y 6MC - MP en ratas Wistar.	76
Gráfico 4-13: Biodistribución de 6MC libre y 6MC - MP en cada órgano evaluado.	77
Gráfico 4-14: Evaluación de la actividad de 6MC libre y 6MC – MP en el curso temporal del edema plantar.....	81
Gráfico 4-15: Inhibición de la inflamación de 6MC libre y 6MC – MP en el modelo de edema plantar por carragenina.....	82
Gráfico 4-16: Concentración de 6MC en la extremidad de ratas Wistar que cursan un proceso inflamatorio.	84

Lista de tablas

	Pág.
Tabla1-1: Evaluación estadística para intercepto, pendiente y regresión como forma de evaluar la linealidad.....	16
Tabla1-2: Evaluación estadística prueba ANOVA como forma de evaluar la linealidad..	17
Tabla 3-1: Propiedades de las micropartículas de policaprolactona cargadas con 6MC.	25
Tabla3-2: Niveles de concentración de las soluciones de trabajo para la validación de la metodología analítica.	27
Tabla 3-3: Tiempos de muestreo escogidos para el estudio de biodistribución.....	32
Tabla 4-1: Características fisicoquímicas determinadas experimentalmente para 6MC..	34
Tabla 4-2: Tiempos de retención para cada molécula, obtenidos experimentalmente. ...	39
Tabla 4-3: Factor de capacidad para cada cumarina empleada para evaluar la idoneidad del sistema.	39
Tabla 4-4: Retención relativa (α) para 6MC respecto a otras cumarinas	40
Tabla 4-5: Límite de cuantificación (LOQ) para cada matriz.	45
Tabla 4-6: Evaluación de linealidad en el sistema.	47
Tabla 4-7: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el sistema.	47
Tabla 4-8: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el sistema.....	48
Tabla 4-9: Evaluación de linealidad en el método 1: Hígado.	49
Tabla 4-10: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el método 1: hígado.....	49
Tabla 4-11: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 1: hígado.	50
Tabla 4-12: Evaluación de linealidad en el método 2: pulmones.	51
Tabla 4-13: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el método 2: pulmones.....	51
Tabla 4-14: Parámetros estadísticos ANOVA Y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 2: pulmones.....	52
Tabla 4-15: Evaluación de linealidad en el método 3: bazo.	53
Tabla 4-16: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el método 3: bazo.	53
Tabla 4-17: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 3: bazo.....	54
Tabla 4-18: Evaluación de linealidad en el método 4: corazón.	55
Tabla 4-19: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el método 4: corazón.	55
Tabla 4-20: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 4: corazón.....	56
Tabla 4-21: Evaluación de linealidad en el método 5: extremidad.	57
Tabla 4-22: Parámetros estadísticos “t” Student para la linealidad de 6MC en el método 5: extremidad.	57

Tabla 4-23: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 5: extremidad.....	58
Tabla 4-24: Evaluación de linealidad en el método 6: riñones.	59
Tabla 4-25: Parámetros estadísticos “t” Student para la linealidad de 6MC en el método 6: riñones.	59
Tabla 4-26: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 6: riñones.....	60
Tabla 4-27: Evaluación de linealidad en el método 7: plasma.	61
Tabla 4-28: Parámetros estadísticos “t” Student para la linealidad de 6MC en el método 7: plasma.	61
Tabla 4-29: Parámetros estadísticos para la linealidad de 6MC en el método 7: plasma.....	62
Tabla 4-30: Precisión y exactitud evaluada en cada uno de los métodos.	64
Tabla 4-31: Exactitud para cada uno de los métodos evaluados en términos de concentración.	65
Tabla 4-32: Determinación de precisión (CV,%) y exactitud (ER,%) para cada uno de los métodos evaluados.	66
Tabla 4-33: Evaluación de la estabilidad de las muestras posterior a tres ciclos de enfriamiento – temperatura ambiente.	68
Tabla 4-34: Evaluación de la estabilidad de las muestras posterior a someterlas a las condiciones más parecidas a las reales estando en el automuestreador.....	69

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura /símbolo	Significado
6MC-libre	6 - metilcumarina en forma libre
6MC-MP	6- metilcumarina microencapsulada
ABC	Área bajo la curva
ANOVA	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
DAD	Detector de arreglo de diodos
°C	Grados Celsius ó centígrados
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (por sus siglas en inglés)
keV	Kiloelectrón volt ($1,60217657 \times 10^{-16}$ Joules)
LOQ	Límite de cuantificación (por sus siglas en inglés)
mAU	Unidades de área *10 ⁻³
min	Minutos
p	Probabilidad
PCL	Policaprolactona
PLA	Ácido poli láctico
PLGA	Ácido poli (láctico co - Glicólico)
®	Marca registrada
T	Temperatura
ΔV	Delta de volumen

Introducción

El estudio de principios activos promisorios para el tratamiento de diferentes enfermedades es uno de los principales objetivos de las Ciencias Farmacéuticas. El componente farmacológico abarca una evaluación mayoritaria de diferentes aspectos que involucran su actividad tales como el mecanismo de acción dentro de la farmacodinamia y su biodistribución, dentro de la farmacocinética, entre otros. Un estudio de biodistribución brinda información acerca de la ruta de fármaco hacia diferentes tejidos de acuerdo a sus características físicas y químicas dando una guía de su comportamiento dentro del organismo. (Mayol 2008).

Por otro lado, los sistemas de entrega de los fármacos son objeto clave de numerosas investigaciones ya que en muchos casos, la eficacia del activo se encuentra limitada por su potencial de alcanzar el órgano blanco porque solo una pequeña porción del activo llega al (los) sitio (s) de acción, mientras que el resto se distribuye en el organismo de acuerdo a sus características fisicoquímicas y bioquímicas (Tiyaboonchai, 2003). Por tal motivo, el desarrollo de sistemas de entrega que optimicen la acción farmacológica, mientras reduce sus efectos tóxicos, es un gran reto para los investigadores y un gran avance científico al desarrollar dichos sistemas con todas las características de estabilidad, viabilidad y principalmente reproducibilidad.

Dentro de dichos sistemas podemos mencionar a las micropartículas las cuales son sistemas coloidales particulados con un tamaño que oscila desde 1 a 250 μm (Sáez *et al.*, 2004). Éstas pueden ser de tipo **microesferas** (sistemas monolíticos de tipo matriz que contienen la sustancia activa en su interior y/o sobre su superficie) o de tipo **microcápsulas** (sistemas reservorio de tipo vesicular que consisten de un núcleo líquido rodeado por una membrana) (Sinko y Martin, 2006).

En las últimas décadas, micropartículas poliméricas biodegradables han sido propuestas como nuevos sistemas transportadores de moléculas biológicamente activas obtenidas

por síntesis tradicional, proteínas, péptidos, ADN, etc., además de productos de uso cosmético y nutracéuticos (vitaminas, antioxidantes, probióticos, etc.) (Irache, 2008), por las grandes posibilidades que ofrecen estos sistemas para mejorar la eficacia terapéutica o solucionar problemas relacionados con la administración. Dentro de los aspectos que se mejoran empleando micropartículas como sistemas transportadores son los problemas relacionados con la estabilidad, solubilidad o velocidad de disolución del principio activo. Además, es posible mejorar la biodisponibilidad, la acumulación específica en el sitio de acción y evitar la degradación en sitios diferentes al órgano blanco permitiendo así un tiempo de actividad prolongado, mayor eficacia y disminución de los efectos adversos (Sinko y Martin, 2006).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó el presente trabajo cuyo principal objetivo fue evaluar la biodistribución de 6 - metilcumarina tanto en forma libre como microencapsulada en un modelo murino (ratas Wistar) de experimentación sano y en el modelo de inflamación de edema plantar inducido por carragenina, también en ratas Wistar. Este trabajo se realizó dentro de los grupos de investigación “Principios Bioactivos en Plantas Medicinales” y “Sistemas de Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas”, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

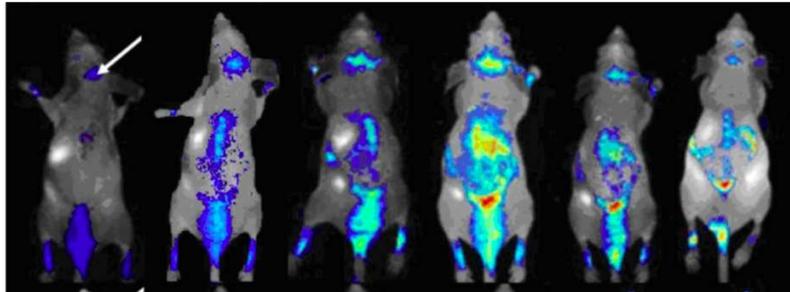
1. Marco teórico

1.1 Biodistribución

Los estudios de biodistribución hacen referencia a la evaluación del tránsito de un compuesto a través del organismo, describiendo no sólo los sitios anatómicos a donde llega luego de alcanzar la circulación general sino también aquellos sitios donde puede acumularse (Mallol, 2008). Estos estudios se hacen con el fin de establecer cuáles son los diferentes tejidos a los cuales llega el principio activo evaluado y la posible relación con el modo de acción.

Algunas recomendaciones para determinar la biodistribución de fármacos sugieren que la evaluación debe realizarse con tres animales por punto de muestreo, siendo cada punto un tiempo determinado después de la administración del principio activo. En cada punto de muestreo se debe hacer el sacrificio de los animales con el fin de extraer los órganos y verificar la distribución y cantidad de activo en cada uno de estos (Mallol, 2008). Algunas de las técnicas más utilizadas para evaluar el tránsito de principios activos en el organismo es el marcaje con compuestos fluoróforos para hacer lectura en tiempo real por fluorescencia, como se observa en la Figura 1-1, derivada de un estudio para evaluar la biodistribución, en ratones macho Balb/c del anticancerígeno **paclitaxel** encapsulado en nanopartículas de poli-caprolactona pegilada; en el estudio se determinó si el fármaco lograba atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. Para este fin se utilizó un marcador lipofílico de fluorescencia de la familia de las carbocianinas (Dir®, Invitrogen, USA) (Xin *et al.*, 2010).

Figura1-1: Imagen de fluorescencia de la biodistribución *in vivo* de paclitaxel cargado en nanopartículas de policaprolactona pegilada.



Tomado de Xin *et al.*, 2010. *International Journal of Pharmaceutics* 402: 238 – 247.

Otra técnica utilizada para los estudios de biodistribución es el radiomarcaje, técnica basada en el uso de trazadores radioisotópicos como el Tecnecio 99 metaestable ^{99m}Tc , emisor gamma puro de 140keV que se obtiene mediante un generador de $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$ y permite ver la localización del compuesto de interés (marcado) en los diferentes órganos del animal inoculado en tiempos hasta de 72h. Un ejemplo de su aplicación fue realizado recientemente por Sánchez y su grupo de trabajo donde evaluaron la biodistribución de nanopartículas radiomarcadas y cargadas con un antígeno de *Brucella ovis* empleado como vacuna contra la brucelosis. El estudio fue llevado a cabo en ratones hembra Balb/c con nanopartículas que fueron hechas con el copolímero metil vinil éter y anhídrido maléico (Gantrez®) para administración ocular. La cuantificación se realizó mediante un contador gamma de centelleo. Una vez sacrificados los animales y separados sus órganos (Figura 1-2) se evidenció que las nanopartículas fueron acumuladas principalmente en la mucosa ocular y que se produjo una liberación controlada del antígeno (Sánchez *et al.*, 2013).

Figura1-2: Evaluación de la biodistribución de nanopartículas radiomarcadas.



Tomado de Sánchez, *et al.*, 2013. *Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular*.

1.1.1 Algunos estudios previos sobre biodistribución

Los estudios de biodistribución se han realizado sobre diferentes moléculas promisorias con el fin de ahondar en sus propiedades farmacológicas. Li y colaboradores en 2008 por ejemplo, evaluaron en ratas Sprague-Dawley la biodistribución y farmacocinética de **orientina**, un flavonoide que ha demostrado amplia actividad antiviral, antimicrobiana y antioxidante. Dentro de los órganos que evaluaron se encontraban hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones, cerebro, estómago e intestino delgado, haciendo muestreos a los 5, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos después de una administración intravenosa. En el estudio se empleó como metodología de cuantificación, un método validado por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Concluido el estudio se encontró que hígado, pulmones y riñones fueron los principales órganos de distribución de orientina en las ratas y aquellos órganos relacionados con la actividad que sobre el sistema respiratorio, urinario y hepatoprotector había sido reportado para este flavonoide, También se encontró que a los 5 minutos la orientina se presentaba ampliamente en todos los órganos evaluados (excepto cerebro por lo cual se concluyó que este compuesto no podía cruzar la barrera hematoencefálica). A los 90 minutos del estudio, orientina no fue detectada en ninguno de los órganos evaluados, lo que sugirió que a largo plazo no había acumulación en los tejidos (Li *et al.*, 2008).

Por otro lado, dentro del conjunto de investigaciones que se han enfocado en encontrar un mejor sistema de entrega de fármacos para alcanzar mejores respuestas con menores efectos adversos, podemos incluir la entrega de moléculas utilizadas para diagnóstico, de las que se requiere alcancen buena parte de los órganos en cantidad suficiente para ser identificadas. Este es el caso del *verde de indocianina*, utilizada actualmente para el diagnóstico de cáncer de seno y piel. Para este agente se ha desarrollado un sistema de entrega nanoparticulado con el fin de aprovechar sus características como colorante de diagnóstico y evitar su rápida eliminación que desde una forma convencional es de 2 a 4 minutos. Además, el sistema microparticulado permitiría favorecer la captación en tumores y la vectorización hacia los mismos. La evaluación de la biodistribución de la forma convencional de entrega y el sistema nanoparticulado se hizo en ratones C57BL/6 sanos, después de una administración intravenosa y una posterior detección por un método fluorimétrico. El contenido de verde de indocianina se evaluó en plasma, hígado,

bazo, riñón pulmón y corazón a los 5, 10, 15, 30, 45, y 60 minutos para indocianina libre y a los 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos para las nanopartículas cargadas con indocianina. En este estudio, para la forma libre los niveles más altos de indocianina se encontraron en hígado y riñones los cuales se proponen como principales órganos de depuración desde la sangre. Para las nanopartículas dichos órganos de depuración son hígado, pulmones y bazo. Por otro lado, el sistema de entrega nanoparticulado alcanzó mayores concentraciones en órganos como hígado, bazo, pulmón, corazón y riñones de 2 a 8 veces, por ejemplo 0.2 µg/g libre frente a 0.8 µg/g encapsulada. En plasma la indocianina liberada desde el sistema nanoparticulado alcanzó concentraciones altas (1.2 µg/g) hasta 4 horas después de la administración lo que indica que hay una liberación controlada desde los órganos donde se acumuló reflejando una alta captación, acumulación y retención, lo que exalta la ventaja de usar este tipo de sistemas (Saxena *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Semete y colaboradores se evaluó la biodistribución, entre otros aspectos, de nanopartículas elaboradas con PLGA en ratones Balb/c, con el fin de obtener información acerca del comportamiento de nanopartículas de esta naturaleza y comparadas con nanopartículas industriales como de óxido de zinc u óxido ferroso. Las nanopartículas sin ningún fármaco, fueron divididas en dos grupos para el marcaje, un grupo con rodamina y el otro con cumarina como agentes fluoróforos; se utilizó un lector de fluorescencia para la lectura, y fue evaluado en cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmones y bazo. Los sistemas de entrega fueron administradas por vía oral y se evaluó durante 7 días encontrándose que a tal tiempo aún se encontraba remanente de las nanopartículas en los órganos evaluados. Los resultados muestran que en orden descendente las partículas se localizaron en hígado, riñón, cerebro y bazo. Como conclusión se obtuvo que las nanopartículas se distribuyeron ampliamente en los órganos altamente permeados y que se detectó una importante acumulación en hígado durante el tiempo (Semete *et al.*, 2010).

Es importante resaltar que en otros trabajos se han elaborado micropartículas de PLA cargadas con **cumarina**. En este caso, la cumarina fue empleada simplemente como un marcador de biodistribución debido a sus propiedades de fluorescencia. Las micropartículas fueron administradas en ratones ICR vía intravenosa al inicio del estudio y

se evaluó la biodistribución en el día 1 y en el día 7 mediante fluorescencia. Los resultados destacan que las micropartículas se acumularon temporalmente en algunos órganos principalmente en pulmón y bazo por lo que se proponen como promisorias para el desarrollo de nuevas aplicaciones como el diseño de sistemas de liberación controlada. Concluyen además que la afinidad por determinado órgano depende del carácter químico de éste y del tamaño del órgano ya que el hígado es 10 a 20 veces más grande que pulmón y bazo por lo que en términos generales la cantidad de micropartículas en ellos podría ser similar (Shigeaki *et al.*, 2010).

Así mismo, otros estudios se han enfocado en demostrar que sistemas de entrega de tamaño nano y micro con diversas modificaciones en su estructura mejoran la biodisponibilidad del fármaco y por ende aumentan su eficacia. Entre estos se encuentra un estudio realizado para nanopartículas preparadas con PLGA modificado tras la conjugación con un heptapéptido y cargadas con **loperamida**; se encontró que el fármaco ejerce un efecto antinociceptivo en ratas hasta cinco veces mayor respecto a la cargada en otras nanopartículas sin modificación y esta a su vez presenta un efecto superior al de la loperamida libre, al atravesar la barrera hemamotencéflica y encontrarse en varias áreas cerebrales. El estudio fue llevado a cabo en ratas Wistar – Hannover y evaluado mediante el método de fluorescencia utilizando rodamina como agente fluoróforo (Tosi *et al.*, 2007). De igual forma, estudios posteriores enfocados en la evaluación de fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central, evidenciaron que el mismo fármaco en nanopartículas bajo condiciones modificadas del PLGA, en este caso con la unión a un péptido específico, atraviesa efectivamente la barrera hematoencefálica y alcanza altas concentraciones a nivel cerebral en donde se requiere su acción farmacológica. Se encontró que una buena proporción del fármaco alcanzó y se mantuvo en el sitio de acción aumentando, como era de esperarse, el efecto antinociceptivo evaluado mediante el test de placa caliente. Dicho efecto fue comparado con la administración del fármaco directamente al cerebro y los resultados no fueron muy diferentes por lo que se sugiere que existe una interacción muy específica entre el péptido y algún componente del cuerpo, como un receptor específico presente en los vasos cerebrales o con componentes de la sangre. Además se comprobó la eficacia de estos sistemas como transportadores y vectorizadores de fármacos (Vergoni *et al.*, 2009).

En otros estudios, utilizando ϵ - poli-caprolactona como polímero y modificado con metoxi polietilenglicol, se demostró que nanopartículas cargadas con **paclitaxel** en terapia anticáncer, específicamente contra el glioblastoma avanzado, alcanzan un mejor acceso al sitio de acción, siendo hasta 3 veces más fuerte que la señal generada por una forma farmacéutica convencional y favoreciendo además la distribución hacia el cerebro y por ende mejorando su eficacia farmacológica. Dicho estudio fue realizado en ratones Balb/c y las nanopartículas fueron marcadas con un fluoróforo comercial (Dir®, Invitrogen) utilizando el método de fluorescencia para la detección. También se tuvo en cuenta la supervivencia de los animales tras la inducción del tumor y posterior tratamiento, mostrando que las nanopartículas cargadas con paclitaxel aumentaron considerablemente el tiempo de vida de los animales (Xin *et al.*, 2010).

Resultados similares fueron encontrados por Liu y colaboradores utilizando el mismo sistema de entrega y modelo murino pero con el fármaco **Docetaxel**, utilizado para tratar cáncer hepático. Se utilizó la fluorescencia para su evaluación ya que las nanopartículas fueron marcadas con isocianato como fluoróforo y se demostró que estas alcanzaron una mayor concentración y una prolongada retención en el tumor comparada con los otros órganos, disminuyendo además el crecimiento del tumor. Las lecturas de fluorescencia fueron hechas en 1h, 2h, 4h, 24h y 48h después de una administración intravenosa. Se evidenció que las nanopartículas favorecieron la vectorización del fármaco hacia el hígado de manera eficiente y como consecuencia mejorando su eficacia farmacológica (Liu *et al.*, 2012).

1.2 Microesferas

Las microesferas fueron introducidas en el campo farmacéutico a mediados de 1970. Son partículas esféricas sin una distinción entre cubierta y núcleo y con un tamaño de partícula entre una y varias decenas de micras. Tienen una estructura monolítica, en la cual el fármaco queda incorporado dentro de una matriz generalmente polimérica preparadas a partir de materiales biodegradables con propiedades biocompatibles y con un gran espectro de velocidades de liberación (Sáez *et al.*, 2004).

Se ha encontrado que las partículas con tamaño micro y nanométrico alcanzan más sitios que otras de mayor tamaño ya que tienen mayor área superficial por unidad de masa lo que les facilita una mayor absorción y por ende llegan a diferentes sitios que de modo convencional no alcanzarían (Oberdörster y Oberdörster 2005). Una propiedad específica de las partículas de estos tamaños es su capacidad para atravesar las barreras biológicas y alcanzar varios órganos atravesando capilares finos y luego siendo absorbidos eficientemente por células; así, aparecen en otras partes del organismo distintas a las de entrada pero manteniendo su integridad como partícula (sin que se produzca disolución) (Oberdörster y Oberdörster 2005).

Los primeros órganos a alcanzar son el hígado, bazo y otros órganos altamente irrigados que se favorecen por el sistema fagocítico mononuclear (Galvez y Tanarro, 2010; Lin *et al.*, 2011). Asimismo, se ha desarrollado un gran interés por la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, piel y otras delgadas uniones de varias capas epiteliales, tomándose como un transporte ideal que no se había logrado de otra forma; es así como se alcanzan respuestas terapéuticas de fármacos que antes no llegaban al sitio de acción (Koziana *et al.*, 2003). En general, las partículas poliméricas se han investigado activamente como portadores de fármacos para llevar agentes terapéuticos a varios sitios de acción y promover una terapia adecuada, dirigida, selectiva y específica, brindando además un sistema protector para la molécula transportada con el fin de mejorar su estabilidad y con esto su acción farmacológica (Panyama y Labhasetwar, 2003; Semete *et al.*, 2010).

Estudios de gran interés para estos sistemas se han enfocado en tratamientos contra el cáncer en los cuales se asocian con el mejoramiento del efecto de retención y permeación que es el filtrado de las nano/micro partículas del torrente sanguíneo al sitio del tumor (debido a la vascularización del sitio) y su subsecuente acumulación allí. Así, este efecto ofrece una vectorización pasiva del sistema de entrega al sitio de acción (Monsky *et al.*, 1999). Con este propósito, la utilización de materiales biodegradables ha aumentado en el campo farmacológico para terapias anticáncer (Shenoy y Amiji, 2005) o para liberación a nivel cerebral (Fresta *et al.*, 1996) donde se requiere específicamente la vectorización y posible acceso. También va en aumento la utilización de estos sistemas biodegradables a nivel agroindustrial (Akelah, 1996) y en el campo cosmético (Muller *et al.*, 2002).

En cuanto al polímero utilizado en el presente estudio, poli-ε-caprolactona PCL es de naturaleza biocompatible y biodegradable, alta permeabilidad a muchos fármacos y baja toxicidad. Permite la distribución uniforme del fármaco en la matriz de formulación y su degradación a largo plazo facilita la liberación del fármaco hasta en varios meses (Dash y Konkimalla, 2012). Su versatilidad es debida al hecho que permite la modificación de sus propiedades físicas, químicas y mecánicas por co-polimerización o mezclado con muchos otros polímeros de manera eficiente. Dentro de los polímeros sintéticos biodegradables, PCL es mucho más resistente a la hidrólisis química y además es aquiral, una característica que limita la posibilidad de modulación a través de la estructura configuracional de la cadena del polímero. Se trata de un polímero cristalino altamente hidrofóbico que se degrada muy lentamente *in vitro* e *in vivo* en ausencia de enzimas. PCL ha sido probado en casi todos los nuevos sistemas de liberación de fármacos y aplicaciones de ingeniería de tejidos en uso y/o investigados hasta ahora (Dash y Konkimalla, 2012).

1.3 Actividad biológica de cumarinas

Las cumarinas, cuyo núcleo es benzo 2 pirona o benzo α pirona, son metabolitos de plantas superiores y algunos pocos microorganismos. Se han aislado unas 1000 cumarinas naturales en unas 150 especies distribuidas en aproximadamente 30 familias, principalmente en Umbeliferae/Apiaceae, Rutaceae, Leguminosae/Fabaceae, Papilionaceae, Rubiaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Solanaceae, Gramineae, etc., en forma libre o como glicósidos (Arango, 2010). Se derivan biosintéticamente del ácido shikímico, vía ácido cinámico, la especificidad del proceso consiste en la hidroxilación del carbono 2, produciendo un rompimiento (β -oxidación) de la cadena lateral (Dewick, 2002).

Dentro de las propiedades de este tipo de moléculas encontramos la fluorescencia generada con la luz ultravioleta a 365nm y la fuerte absorción de las cumarinas simples a 274 y 311 nm (log ϵ : 4.03 y 3.72) debido a los anillos bencénico y α pirona respectivamente. Dicha absorción presenta variaciones según sus sustituyentes, siendo una ventaja ampliamente usada para su detección (Arango, 2010).

El potente núcleo básico Cumarina (2H-cromen-2-ona) puede ser sustituido en varias posiciones y así mismo ampliar su rango de actividad farmacológica. Dentro del espectro de actividad de estas moléculas se encuentra la actividad antiinflamatoria la cual ha sido evaluada en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* para cumarinas complejas obtenidas por síntesis o aisladas de diferentes plantas. Es así como un derivado cumarínico 7 -8 sustituido nombrado **libanoridina**, aislado de *Corydalis heterocarpa* ha mostrado potencial antiinflamatorio al evaluarse *in vitro* donde fue capaz de inhibir los niveles de expresión de proteínas de mediadores inflamatorios tales como la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleuquina-1b (IL-1b). El efecto fue dependiente de la dosis en células humanas de carcinoma de colon estimuladas con lipopolisacárido (LPS-HT-29) (Kang *et al.*, 2009). De manera análoga, otro grupo sintetizó un derivado cumarínico metil 2,2-dimetil-8-oxo-3,8-dihidro-2H-furo[2,3-h]cromen-6-carboxilato, con promisorio actividad antiinflamatoria que fue evaluada en ratas Fisher 344 mediante el modelo de edema plantar inducido por carragenina en el cual en dosis de 0.01 mmol/kg presentó un porcentaje de inhibición de la inflamación del 65%(Symeonidis *et al.*, 2009).

Asimismo, ha sido reportada importante acción antiinflamatoria de derivados como ariloximetilo cumarinas en las posiciones 3, 4 y 5 del núcleo básico, formando compuestos con grupos ortoformilo que posteriormente genera los ésteres que actúan como precursores de grupos carboxílicos responsables de la actividad antiinflamatoria, demostrada *in vivo* en ratas Wistar mediante el modelo de edema plantar inducido por carragenina y el modelo de granuloma inducido por algodón con porcentajes de inhibición de la inflamación alrededor del 64% (Ghate *et al.*, 2003). Similar a lo encontrado, los derivados cumarina 3-carboxiamida conjugados con ácido lipoico mostraron importante actividad antiinflamatoria en ratas Fisher 344 mediante el modelo de edema plantar inducido por carragenina con porcentajes de inhibición de la inflamación por encima del 50% y hasta 72% con una dosis de 0.01 mmol/kg (Melagraki *et al.*, 2009). Un derivado cumarínico 3 piperazina sustituido mostró importante actividad antiinflamatoria en el modelo de pleuresía inducida por carragenina en ratas Sprague-Dawley en dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg a través de la inhibición de la permeabilidad vascular y la transmigración de leucocitos, lo cual podría estar relacionado con la reducción de la liberación de factores inflamatorios (Li *et al.*, 2011). En otros modelos de inflamación como inflamación pulmonar inducida por lipopolisacárido LPS y lesión pulmonar aguda inducida por

elastasa, también se ha reportado actividad de derivados cumarínicos evaluada en ratones C57BL/6. Uno de ellos principalmente, inhibidor de elastasa, redujo significativamente el número de células inflamatorias lo que sugiere que presenta promisorio actividad antiinflamatoria de vías aéreas con dosis de 1 $\mu\text{mol/kg}$ (Bissonnette *et al.*, 2009).

En el modelo de inflamación alérgica de vías respiratorias evaluado mediante la resistencia pulmonar inducida por cloruro de acetilcolina en ratones Balb/c se evaluó el potencial de cumarinas aisladas de *Peucedanum praeruptorum* como agentes antiasmáticos. Como indicador se usó el recuento leucocitario, lesiones en el tejido y recuento de interleuquinas y se encontró que las cumarinas tuvieron la capacidad de suprimir la inflamación bronquial inducida, mostrando un gran potencial terapéutico para el tratamiento de la alergia (Xiong *et al.*, 2012). Derivados cumarínicos de *Urtica dentata* han sido evaluados en modelos de artritis inducida por colágeno demostrando importante protección contra ésta en ratones Balb/c al provocar tolerancia inmune (Luo *et al.*, 2011).

Otros derivados cumarínicos presentan su acción sobre el sistema cardiovascular, por ejemplo la acción anticoagulante de **dicumarol** actuando como inhibidor de la vitamina K que es esencial en el proceso de coagulación de la sangre. Éste fue el primer anticoagulante oral en el hombre (Galbis, 2000) o la **warfarina**, inhibidor de la enzima epóxido reductasa interfiriendo en el metabolismo de la vitamina K entre otras actividades demostradas (Belij *et al.*, 2012).

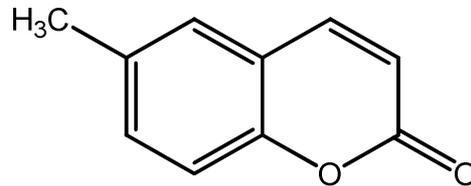
Sobre el sistema nervioso central también se ha reportado importante actividad de derivados cumarínicos tanto naturales como sintéticos, los cuales son capaces de inhibir acetilcolinesterasa por unión a su sitio aniónico periférico que es un blanco importante en el manejo de la enfermedad de Alzheimer (Anand *et al.*, 2012). También derivados 3 – fenilcumarínicos demostraron actividad antidepresiva en ratones albinos suizos mediante el modelo de test de suspensión de la cola con una reducción significativa de la duración de la inmovilidad en bajas dosis (0.5 mg/Kg) (Sashidhara *et al.*, 2011).

También se ha reportado actividad basada en toxicidad frente a células cancerígenas tanto para cumarinas naturales como sintéticas aunque aún no se reconoce el mecanismo

de acción con claridad (Kostova, 2005). Toxicidad frente a patógenos como *Candida albicans* también ha sido evaluada para derivados cumarínicos conformando complejos con plata (Ag) que interrumpen la función respiratoria e inducen apoptosis (Thati *et al.*, 2007).

Algunas cumarinas simples como la **umbeliferona** (7-hidroxycumarina) destacada por su importante actividad antioxidante, han sido evaluadas como antiinflamatorios desde hace varios años (Hoult y Payá, 1996). En estudios recientes, esta cumarina ha demostrado actividad en el modelo de inflamación alérgica de vías respiratorias en ratones Balb/c inducida por ovoalbúmina, donde mostró una marcada reducción del número de células inflamatorias y eosinófilos, disminución de moco e inflamación del pulmón, características del asma alérgica, por lo que se considera molécula promisorio para el desarrollo de fármacos antiasmáticos (Vasconcelos *et al.*, 2009).

Por otro lado, **6 – metilcumarina 6MC** (Figura 1-3) ha sido empleada en estudios farmacológicos previos en el Departamento de Farmacia demostrando importante actividad en modelos de inflamación aguda tales como el modelo de edema plantar inducido por carragenina en ratas Wistar con el que se provoca una liberación de diversos autocoides como serotonina, histamina, bradicinina y prostaglandinas además de diversos factores del complemento implicados en la amplificación de la respuesta. Allí se encontró que 6MC, con una dosis de 100 mg/Kg, inhibió considerablemente la formación del edema 3 horas después de la inyección del agente proinflamatorio (carragenina) y 5 horas después aún mantuvo el efecto inhibitor del edema. En el modelo de bolsa de aire / zimosán en ratas Wistar, en el cual se genera una estructura similar a la membrana sinovial con cúmulo de macrófagos morfológica, bioquímica e inmunológicamente similares a las células tipo A de la sinovia para estudiar efectos en la morfología, actividad enzimática y producción de mediadores inflamatorios, 6MC produjo una disminución del reclutamiento neutrofílico en la bolsa de aire. Mecanismo que seguramente contribuye con el efecto antiinflamatorio observado en el edema plantar por carragenina, y el cual se ve reflejado en los bajos niveles enzimáticos de elastasa y mieloperoxidasa en el exudado de la bolsa de aire (Vergel, 2010).

Figura 1-3: Estructura de 6-metilcumarina.

1.4 Metodología analítica

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) es la técnica de separación más ampliamente utilizada en la actualidad debido a su sensibilidad, a su adecuación para realizar determinaciones cuantitativas exactas y a su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas. Existen tres características básicas por las cuales se puede dar la separación en CLAE (o HPLC por sus siglas en inglés): por polaridad, en donde las moléculas con polaridad cromatográfica similar tienden a atraerse; por carga eléctrica, donde moléculas con carga de igual signo se repelen y con signo distinto se atraen; y por tamaño molecular, donde de acuerdo al tamaño de poro de la fase estacionaria las moléculas son retenidas o no (Alfonso, 2008).

Para el caso en particular del presente trabajo fue usada la separación cromatográfica por polaridad, con detector ultravioleta. Así pues, con el mecanismo del detector utilizado es importante resumir que la espectrofotometría ultravioleta-visible es uno de los métodos más sencillos, accesibles, útiles y utilizados en análisis cuantitativo. En el ultravioleta y el visible se presenta absorción y emisión de radiación como consecuencia de la transición electrónica en las capas externas de los átomos y las moléculas. La región ultravioleta está comprendida entre 180-380nm. La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste como se establece en las leyes de Lambert y Beer (Eugene, 1990).

En general, las metodologías analíticas son de vital importancia para el desarrollo de cualquier estudio de carácter científico. Es necesario familiarizarse con ellas, entender su

fundamento y adaptar las mejores herramientas que nos conduzcan a obtener resultados veraces, reproducibles y confiables. Cualquier método analítico antes de ser utilizado debe ser validado; es decir, realizar las comprobaciones que aseguran que el método es científicamente correcto en las condiciones en que va a ser aplicado (RELE, 1994). La validación de métodos bioanalíticos incluye todos los procedimientos que demuestran que un método en particular usado para la determinación cuantitativa de analitos en matrices biológicas, como sangre, plasma, suero, orina u otro tejido, son confiables y reproducibles para el uso propuesto (FDA, 2001). Los parámetros a validar para metodologías bioanalíticas son: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite más bajo de cuantificación y estabilidad (AEFI, 2001).

1.4.1 Selectividad y especificidad

El método **específico** es aquel que produce una respuesta para el analito que se quiere medir y otros componentes presentes en la muestra no influyen en el resultado, mientras que el término **selectividad** se refiere al método que produce respuesta para un número de entidades químicas. Si la respuesta para el analito de interés es distinguida de todas las otras respuestas, el método es selectivo. Es decir, comprobar que entre las interferencias propias de la matriz y de componentes que también puedan ser detectados la respuesta para la molécula de interés sea validada (AEFI, 2001).

1.4.2 Linealidad

La linealidad de un método analítico es la capacidad dentro de un rango definido de obtener resultados proporcionales, bien de forma directa o bien por medio de una transformación matemática, a la concentración de analito en la muestra.

El rango de un método analítico es el intervalo en el cual se ha demostrado que el método analítico presenta un adecuado nivel de precisión, exactitud y linealidad. Dicho parámetro se evalúa mediante la curva de calibración, que es la relación existente entre la respuesta experimental que produce un determinado analito y las concentraciones del mismo. La curva de calibración es la función respuesta más simple que relaciona respuesta instrumental con concentración, caracterizada por el rango y la linealidad.

La curva de calibración se debe construir con muestras patrón preparadas en la matriz en la cual se cuantificará el analito, añadiendo concentraciones conocidas de éste y sometiéndolas al proceso de extracción y análisis. El rango vendrá determinado por las concentraciones esperadas en las muestras (AEFI, 2001).

Para demostrar la linealidad se utilizan métodos como:

- a) Demostrar que el intercepto no es significativamente diferente de cero, que el coeficiente de correlación r es significativamente diferente de cero y que la pendiente es significativamente diferente de cero (Tabla 1-1; Ecuaciones 1-1, 1-2 y 1-3) (AEFI, 2001).

Tabla1-1: Evaluación estadística para intercepto, pendiente y regresión como forma de evaluar la linealidad.

EVALUADOR	HIPÓTESIS	p	gl	MODELO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Intercepto	$H_0 : \alpha = 0$ $H_1 : \alpha \neq 0$	0.05	$n - 2$	$t_{a(\text{exp})} = (a - \alpha) s_{(a)}$	$t_{a(\text{exp})} < t_{(\text{tab})}$
Pendiente	$H_0 : \beta = 0$ $H_1 : \beta \neq 0$	0.05	$n - 2$	$t_{(b) (\text{exp})} = (b - \beta) / s_{(b)}$	$t_{(b) (\text{exp})} > t_{(\text{tab})}$
Coefficiente de correlación	$H_0 : r = 0$ $H_1 : r \neq 0$	0.05	$n - 2$	$t_{r(\text{exp})} = (r (n - 2)^{1/2}) / (1 - r^2)$	$t_{r(\text{exp})} > t_{(\text{tab})}$

p: probabilidad de error. gl: grados de libertad. $t_{(\text{exp})}$: valor numérico obtenido de la prueba "t" student. $t_{(\text{tab})}$: valor numérico tabulado de la prueba "t" student.

Ecuación 1-1: Desviación estándar del intercepto.

$$S (a) = \sqrt{S^2 (b) \sum \frac{x^2}{n}}$$

Ecuación1-2: Desviación estándar de la pendiente.

$$S (b) = \sqrt{\frac{S^2(x,y)}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Ecuación1-3: Varianza del error experimental total.

$$s^2_{(x,y)} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2}$$

$s^2_{(x,y)}$, también llamada varianza residual o varianza de regresión de y sobre x debida a la variación dentro de la serie más la variación debida a la falta de ajuste entre la recta de regresión y los datos experimentales. “n” equivale al número de muestras.

- b) Efectuando un análisis de varianza, o ANOVA, se puede demostrar simultáneamente si hay o no diferencias significativas entre las concentraciones (si hay o no una buena correlación) y si hay o no desvío de la linealidad (diferencias significativas entre las respuestas para una misma concentración). Desde el punto de vista estadístico el ANOVA es el método más riguroso para determinar si la metodología presenta buena regresión y a la vez si no se presenta desvío de la linealidad. En el ANOVA el estadístico a utilizar es la F de Fisher (AEFI, 2001; FDA, 2001).

Tabla1-2: Evaluación estadística prueba ANOVA como forma de evaluar la linealidad.

Causa de variación	Hipótesis	gl	Sc	CM	Fexp	Criterio de aceptación
Regresión	Ho: la regresión entre x y y no es significativa	1	Scr	(Scr/gl) = CM1	CM1/CM3	Fexp > F tab
Linealidad	Ho: no hay diferencia significativas entre concentraciones	k-2	Scdl	(Scdl / k-2)=CM2	CM2/CM3	Fexp < F tab
Error puro	Ho: no hay diferencia significativa dentro de las concentraciones	n-k	Scep	Scep / (n-k) =CM3		

k: concentraciones trabajadas., m el número de réplicas, n número total de determinaciones (n = mk); gl: grados de libertad; SC: sumatoria de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher.

Ecuación1-4: Desviación estándar de la linealidad.

$$s_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

Ecuación1-5: Desviación estándar de la regresión.

$$s_{xy} = \sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}$$

Ecuación1-6: Suma de cuadrados para la regresión.

$$SCr = (s_{xy})^2 \frac{(S_{xy})^2}{S_{xx}}$$

Ecuación1-7: Suma de cuadrados del error puro.

$$SCep = \sum y^2 - \left[\frac{\sum \sum (Y_j)^2}{m} \right]$$

Ecuación1-8: Suma de cuadrados entre concentraciones

$$SCec = \left[\frac{\sum \sum (Y_j)^2}{m} \right] - \left[\frac{(\sum \sum Y)^2}{n} \right]$$

Ecuación1-9: Suma de cuadrados para el desvío de la linealidad:

$$SCdl = Scec - Scr.$$

1.4.3 Precisión y Exactitud

La **precisión** de un método analítico hace referencia a la concordancia entre los distintos resultados obtenidos cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea (FDA, 2001).

La **exactitud** es la capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más cercanos posibles al valor teórico (valor nominal) es decir, el grado de concordancia entre el valor verdadero y el valor experimental (FDA, 2001).

La precisión y exactitud deben ser valoradas a dos niveles: INTRAENSAYO, representativa de la variedad obtenida en las mismas condiciones de trabajo y un corto intervalo de tiempo e INTERENSAYO, representativa de la variabilidad obtenida en diferentes series analíticas (distintos días, analistas, reactivos, aparatos, etc.). Debe ser evaluado en tres niveles de concentración (alta, media y baja del rango de linealidad establecido) en la matriz biológica. Se recomienda efectuar 5 determinaciones por cada nivel de concentración y ensayo.

Las concentraciones de los patrones utilizados para el cálculo de la exactitud y precisión del método se determinan a partir de la curva de calibración del ensayo (AEFI, 2001; FDA, 2001).

1.4.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ), es la concentración más baja de un analito que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. La respuesta del analito al LOQ debe ser por lo menos 5 veces la respuesta comparada con la respuesta del blanco. La respuesta del analito debe ser identificable, discreto y reproducible con una precisión $\leq 20\%$ y una exactitud de $\pm 20\%$. Existen varios métodos para su determinación, en este caso particular fue usado el método de *Diluciones* en donde se obtienen diluciones de concentraciones crecientes del analito en el sistema y en la matriz, hasta encontrar la concentración más baja que dé respuesta (AEFI, 2001; FDA, 2001).

1.4.5 Estabilidad

La estabilidad de un fármaco en un fluido biológico es función de las condiciones de almacenamiento, propiedades químicas del fármaco, de la matriz y del recipiente. La estabilidad de un analito en un sistema matriz-recipiente es relevante solo a esa matriz y clase de recipientes y no debe extrapolarse a otras matrices ni recipientes. Las condiciones usadas en los experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones probablemente encontradas durante la manipulación real de las muestras y el análisis:

- a) Estabilidad al Enfriamiento – temperatura ambiente.
- b) Se debe determinar la estabilidad del analito después de tres ciclos de Enfriamiento – temperatura ambiente. Por lo menos deben almacenarse 3 alícuotas tanto de la concentración más baja como de la concentración más alta a la temperatura de almacenamiento usada por 24 horas y descongelarse a la temperatura ambiente. Cuando estén totalmente temperadas deben reenfriarse por 12-24 horas bajo las mismas condiciones. Debe repetirse dos veces más el ciclo enfriamiento – temperatura ambiente. y analizar las muestras al tercer ciclo.
- c) Estabilidad Post-Preparativa

Se debe determinar la estabilidad de las muestras procesadas a la temperatura del automuestreador y durante el tiempo de permanencia en éste hasta la inyección. Para esto se recomienda fijar un tamaño de lote adecuado. Si por ejemplo se van a procesar lotes de 20 muestras se debe calcular cuánto tiempo dura la corrida de las 20 muestras, incluidas las muestras de control de calidad. Si la corrida dura en

promedio 20 horas, se debe asegurar la estabilidad de las muestras durante el tiempo de permanencia en el automuestreador (FDA, 2001).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la biodistribución en ratas de 6-metilcumarina libre y microencapsulada en un polímero biodegradable.

2.2 Objetivos específicos

Implementar una técnica analítica que permita la cuantificación de 6-metilcumarina tanto en plasma como otros tejidos de importancia.

Identificar el efecto de la microencapsulación sobre la biodistribución de la 6-metilcumarina tanto en animales sanos como en animales que cursen procesos inflamatorios.

Verificar en modelos de inflamación el efecto farmacológico de la 6- metilcumarina libre y microparticulada y el posible efecto del sistema de entrega en la efectividad de este compuesto.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Equipos

- a) Cromatógrafo Agilent Technologies® 1200 series
- b) Centrífuga KASAI® referencia MIKRO 220R
- c) Pletsimómetro Ugo Basile® 7140
- d) Politron PT-10- 35.

3.1.2 Reactivos

6 - metilcumarina (6MC), 6- hidroxycumarina, 7- hidroxycumarina y cumarina adquiridas de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). Ácido tricloroacético y ácido acético (grado reactivo analítico) de Merck. Metanol (HPLC), de JT Baker. Agua de calidad HPLC obtenida a través del sistema milliQ de Millipore Co®.

3.1.3 Animales de experimentación

Aunque ningún modelo animal reproduce con fidelidad las patologías presentadas en humanos aún no podemos prescindir totalmente de ellos en la investigación. En este caso requerimos de ellos para comprender el curso de un proceso biológico fundamental.

Para el estudio se utilizaron ratas Wistar macho de 12 semanas de edad y con peso de 250 ± 10 g obtenidas del bioterio de experimentación del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Se escogieron éstas por ser un modelo apto para el tipo de análisis, fácil manejo y resultados reproducibles; además son el modelo adaptado en los protocolos del modelo de inflamación utilizado.

3.1.4 Consideraciones éticas

Los ensayos fueron llevados a cabo teniendo en cuenta los principios éticos en el manejo de animales de laboratorio, consignados en la Ley 84 de 1989 y en las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud” establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y la Recomendaciones de la Federación de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorios europeos (FELASA, 1996). Además, se tuvo en cuenta las recomendaciones internas de la Universidad Nacional de Colombia y del bioterio del Departamento de Farmacia, relativas al manejo y cuidado del animal de experimentación. La disposición de los residuos biológicos se hizo de acuerdo a los protocolos de riesgo biológico establecidos en la Universidad Nacional de Colombia.

El desarrollo de este trabajo fue avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Acta N° 08 de 2011).

3.1.5 Micropartículas

Las micropartículas utilizadas en este estudio fueron obtenidas en un trabajo paralelo dentro del grupo de investigación SILICOMOBA. (Barrera, 2012).

Brevemente, el polímero policaprolactona PCL y 6MC se disolvieron en diclorometano (DCM). A continuación la fase orgánica se emulsificó con la fase acuosa que contenía alcohol polivinílico al 2% como agente estabilizante. Se llevó a cabo por un proceso de homogenización usando ultraturrax® T-10 a 19.000 rpm. Una vez formada la emulsión se mantuvo bajo agitación constante durante 2 horas con el fin de eliminar el solvente orgánico por evaporación e inducir la formación de las micropartículas. Posteriormente fueron separadas por centrifugación, lavadas con agua destilada y liofilizadas.

Las características finales de las micropartículas utilizadas en el presente estudio están resumidas en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Propiedades de las micropartículas de policaprolactona cargadas con 6MC

Rendimiento del proceso (%)	Eficiencia de encapsulación (%)	Efecto Burst (%)	Tamaño de partícula dvs (μm)
77.2 \pm 2.3	67.8 \pm 3.4	33.5 \pm 0.8	8.3

dvs: diámetro volumen superficie.

(Barrera, 2012).

3.2 Metodología

3.2.1 Desarrollo del método analítico por CLAE

3.2.1.1 Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo Agilent® 1200 Series con un auto muestreador G1329B, bomba cuaternaria G1311A, detector UV-VIS de arreglo de diodos G1315B y desgasificador de vacío G1322A. Como fase estacionaria se utilizó una columna Phenomenex® (Macclesfield, Reino Unido) bonclone 10 μm C-18 (150 x 3,9mm – 148A) y como fase móvil un gradiente compuesto de (A) metanol y (B) agua:metanol:ácido acético (95:5:1 v/v). En la Figura 3-1 se presenta el esquema del cromatógrafo empleado.

Los datos se recogieron mediante el software ChemStation®. Todos los análisis cromatográficos se realizaron por triplicado.

Figura 3-1: Esquema gráfico de las condiciones experimentales para el desarrollo de la metodología analítica.



3.2.1.2 Método cromatográfico

Teniendo en cuenta estudios previos desarrollados para 7-hidroxycumarina en plasma humano (Bogan y Kennedy, 1996), se desarrolló un método de acuerdo a nuestras necesidades y condiciones de trabajo. Se utilizó para el desarrollo analítico del estudio la cromatografía líquida de alta eficiencia CLAE (HPLC) con detector de arreglo de diodos en fase reversa. Se realizaron análisis previos para la determinación de la longitud de onda de máxima absorción para la lectura, se estableció el gradiente de elución, la temperatura de la columna y las condiciones de las fases móviles.

3.2.1.3 Preparación de las muestras

- Soluciones estándares:

Se prepararon soluciones madre de 6 - metilcumarina por triplicado así:

$$10 \text{ mg 6MC} / 50 \text{ mL (metanol: agua 50:50)} = 200 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

De esta primera solución se tomaron 10 mL y fueron completadas a 50 mL en el mismo solvente con el fin de alcanzar 40 $\mu\text{g/mL}$.

- Soluciones de trabajo:

A partir del estándar se hicieron los cálculos para obtener diluciones seriadas entre 25,6 y 0,4 $\mu\text{g/mL}$.

Para determinar el límite de detección se prepararon de igual forma diluciones seriadas a partir del nivel más bajo de concentración del anterior grupo mencionado.

Para evaluar la selectividad del método frente a otras cumarinas se prepararon soluciones madre de la misma forma para 6-hidroxycumarina, 7-hidroxycumarina y cumarina.

Para la validación en cada matriz biológica se utilizaron soluciones preparadas de igual forma y adicionadas a cada matriz "muestras enriquecidas", en proporción 1:1 teniendo en cuenta alcanzar las concentraciones indicadas entre 0,8 y 12,8 $\mu\text{g/mL}$ (cada nivel a la mitad por la dilución con la matriz) (Tabla 3-2).

Tabla3-2: Niveles de concentración de las soluciones de trabajo para la validación de la metodología analítica.

Nivel de concentración	1	2	3	4	5	6
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	0,8	1,6	3,2	6,4	12,8	25,6

3.2.1.4 Método de extracción

Los órganos en los cuales se evaluó la distribución de 6MC fueron corazón, pulmones, riñones, bazo, hígado, plasma y la extremidad inferior derecha de ratas Wistar. Esta última fue definida teniendo en cuenta que el activo ha demostrado actividad antiinflamatoria en el modelo de edema plantar y era de nuestro interés evaluar la concentración de 6MC en dicho órgano blanco.

Para el método de extracción se realizó un homogenado de tejido en presencia de ácido

tricloroacético (TCA), un agente precipitante de proteínas. Cada órgano se homogenizó con TCA al 20% (p/v) en proporción 1:1 frente al peso del tejido mediante un politrón PT-10-35. Posteriormente el homogenado se centrifugó a 13000 rpm a 4°C, durante 10 minutos y el sobrenadante fue recuperado.

Para las muestras de sangre, en lugar de la homogenización, se realizó una centrifugación previa a 3000 rpm durante 10 minutos con el fin de precipitar células grandes como glóbulos rojos y trabajar con plasma, al que se le adicionó posteriormente TCA al 20% (p/v) en proporción 1:1 y se centrifugó de igual forma como se describe previamente con el fin de eliminar proteínas remanentes.

Tanto soluciones de trabajo, como muestras biológicas fueron rotuladas, protegidas adecuadamente y mantenidas en el congelador a 4°C.

3.2.1.5 Idoneidad del sistema

Aunque la idoneidad del sistema no constituye un parámetro de validación si es condición para que el método que se va a validar se pueda considerar como idóneo y fiable.

El analito de interés, mezclado con compuestos similares, se utilizó para determinar el tiempo de retención (t_r), factor de capacidad (k), factor de separación (∞), número de platos teóricos (n), resolución (R), altura equivalente de plato teórico (H) y factor de coe.

3.2.2 Validación de la metodología analítica

Como se mencionó previamente, los parámetros a validar para metodologías bioanalíticas sugeridos por la ICH (ICH, 2005) son: linealidad, selectividad y especificidad, límite más bajo de cuantificación, precisión, exactitud y estabilidad. Esta etapa permitió conocer la fiabilidad del método en su aplicación rutinaria siendo la fiabilidad la capacidad del método para conservar los parámetros que se han validado. En este estudio se validaron los parámetros antes mencionados para la cuantificación de 6MC en cada una de las matrices biológicas utilizadas.

3.2.2.1 Linealidad

Una metodología presenta linealidad cuando se observa que al variar la concentración hay un cambio significativo y proporcional en la respuesta instrumental. La linealidad solo compromete al intervalo de concentraciones consideradas en el estudio y no debe extrapolarse a valores fuera de dicho rango. El rango utilizado fue el más bajo posible (0,4 a 12,8 $\mu\text{g/mL}$) con el objetivo que las concentraciones encontradas en muestras biológicas estuvieran dentro de éste. Para determinar la linealidad para 6MC en cada una de las matrices se trabajaron 3 réplicas y 5 niveles de concentración. El sistema correspondió a las muestras iniciales (metanol: agua). Para la linealidad del método en cada matriz fue utilizada la prueba estadística “t” Student, posterior a una prueba “F de Fisher” para análisis de varianza. En ambos casos el nivel de significancia fue $p < 0.05$.

3.2.2.2 Especificidad y selectividad

Se considera como especificidad a la capacidad de un método para diferenciar y cuantificar uno o varios analitos en presencia de otros componentes que se sospecha puedan estar presentes en la mezcla (Ravichandran *et al.*, 2010). Las sustancias potencialmente interferentes en una matriz biológica incluyen componentes endógenos de la matriz, metabolitos, productos de degradación, impurezas, etc. Para evaluarla se utilizó una mezcla de cumarinas relacionadas estructuralmente (cumarina, 6-hidroxycumarina, 7- hidroxycumarina y 6 – metilcumarina) y su criterio de aceptabilidad fue el tiempo de retención en los cromatogramas para cada matriz. En términos de selectividad, también se evaluó la capacidad del método para diferenciar claramente la molécula de interés de los demás componentes que pueden estar presentes en la muestra, como solventes, endógenos de la matriz, entre otros (Ravichandran *et al.*, 2010).

3.2.2.3 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la concentración más baja de un analito que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas (AEFI, 2001).

Para determinarlo se hicieron diluciones descendentes, desde el último punto de concentración del rango evaluado. Se realizó por triplicado hasta donde se pudiera encontrar en el cromatograma un área adecuada para integrar y que el coeficiente de variación y la exactitud fueran inferiores al 20%.

3.2.2.4 Precisión

La precisión hace referencia a la concordancia entre los distintos resultados obtenidos cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea (FDA, 2001). Se evaluó por medio del coeficiente de variación (CV%) entre ellas a dos niveles intra e inter ensayo y el valor de aceptación para cada nivel debe ser $CV \leq 15\%$. Para ello se utilizaron muestras biológicas enriquecidas con las concentraciones equivalentes a 0.4, 3.2 y 6.4 $\mu\text{g/mL}$.

La precisión del método fue calculada como el coeficiente de variación (% CV o % RSD) de mediciones intra e inter día. La precisión intradía se evaluó en muestras biológicas preparadas dentro del mismo día (a tres niveles de concentración). La precisión interdía se evaluó en muestras biológicas preparadas en tres días diferentes (a cada nivel de concentración). El % RSD (Ecuación 3-1) se determinó en cada nivel de concentración y se expresó como el promedio de los resultados junto con su respectiva desviación estándar.

Ecuación3-1: Desviación estándar relativa expresada en porcentaje.

$$\%RSD = (\text{desviación estándar} / \text{promedio}) * 100$$

3.2.2.5 Exactitud

La exactitud es el grado de concordancia entre el valor verdadero y el valor experimental. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberán corregirse. De igual forma que la precisión, se evalúa a nivel intra e inter ensayo y su valor de aceptación debe ser $\leq 15\%$. (AEFI, 2001; FDA, 2001).

La exactitud del método fue demostrada mediante el porcentaje de error relativo (% ER). Se utilizaron tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) dentro del rango escogido.

Las concentraciones calculadas se obtuvieron mediante la ecuación generada de cada curva de calibración, respecto al valor real adicionado se calculó el error absoluto (Ecuación 3-2) y posteriormente el error relativo (Ecuación 3-3).

Ecuación3-2: Error absoluto

$$EA = \text{valor calculado} - \text{valor real}$$

Ecuación3-3: Error relativo expresado en porcentaje

$$\%ER = (EA / \text{valor real}) * 100$$

3.2.2.6 Estabilidad de las muestras

Se debe asegurar la estabilidad del analito hasta la obtención de resultados. Para esto se determinó la estabilidad del analito después de tres ciclos de enfriamiento – temperatura ambiente por triplicado en dos niveles de concentración (0,4 y 12,8 µg/mL) para cada matriz. Dichas muestras fueron sometidas desde su preparación a tres ciclos de enfriamiento (24h a 4°C) – temperatura ambiente (24 h temperatura ambiente, 21°C). Se realizó análisis cromatográfico de las muestras frescas y luego de tres ciclos ciclo de descongelamiento.

Permite evaluar la estabilidad de los analitos con base en el tiempo estimado de permanencia a temperatura de congelación.

Por otro lado, se determinó la estabilidad de las muestras sometidas en un periodo de permanencia en el automuestreador y a la temperatura de éste con el fin de garantizar que no se alteran mientras se encuentren en el equipo cromatográfico:

Tiempo de permanencia 44 h equivalente a 80 muestras con corridas de 33 minutos aproximadamente. Temperatura del automuestreador: 23 - 24° C.

3.2.3 Estudio de biodistribución

En una primera parte se llevó a cabo el estudio de biodistribución, por vía intraperitoneal, en animales sanos con el fin de caracterizar el perfil de biodistribución de 6-metilcumarina libre (6MC – libre) y por otro lado la biodistribución de la misma en el sistema de entrega microparticulado (6MC – MP). La dosis fue definida en 200 mg/kg de 6MC para ambas formas de entrega.

Al fin de cada punto de muestreo los animales (tres por grupo) fueron sacrificados por dislocación cervical tomando muestras de sangre de compartimento central (corazón) y retirando los órganos de interés. Los tiempos de muestreo se reportan en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Tiempos de muestreo escogidos para el estudio de biodistribución.

Sistema de entrega	15min	30min	60min	120min	240min
6MC -libre	X	X	X	X	-----
6MC - MP	X	X	X	X	X

3.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de 6MC libre y 6MC – MP.

Se llevó a cabo el estudio de actividad en el modelo de inflamación de edema plantar inducido por carragenina, con el ánimo de comprobar la actividad antiinflamatoria descrita en trabajos previos para 6MC y evaluar el posible efecto del sistema de entrega sobre la respuesta antiinflamatoria (Vergel, 2010).

La respuesta inflamatoria fue inducida por la inyección de carragenina lambda (0,05 mL; 3% en solución salina normal), vía subplantar, en la almohadilla plantar izquierda - trasera de los animales. Los animales fueron divididos en tres grupos de 10 animales cada uno:

Grupo A: animales con carragenina + 6MC – libre (200 mg/Kg vía i.p.).

Grupo B: animales con carragenina + 6MC – MP (200 mg/Kg vía i.p.).

Grupo C (control): animales con carragenina + solución salina (1mL/Kg vía i.p.).

Todos los tratamientos fueron administrados media hora antes de la administración de carragenina.

Se midió el volumen de las patas en un pletismómetro Ugo Basile® (Figura 3-2) a las 1h, 3h, 5h, 7h y 24h después de administrada la carragenina. El porcentaje de inhibición de la inflamación fue calculado mediante la Ecuación 3-4:

Ecuación3-4: Porcentaje de inhibición del edema.

$$\% \text{ de inhibición del edema} = 100 - (100 \times \Delta V \text{ problema} / \Delta V \text{ control})$$

En la cual ΔV problema corresponde a la variación de volumen de las patas de cada animal tratado con 6MC y ΔV control es la variación promedio del volumen de las patas del grupo control (vehículo).

FIGURA 3-2: Pletismómetro Ugo Basile® de desplazamiento de agua.



(Winyard y Willoughby 2003).

A la 5ª hora de inducción del edema plantar se escogieron aleatoriamente tres animales del grupo A y tres animales del grupo B y se sacrificaron con el ánimo de cuantificar la cantidad de 6MC que se encontraba en los diferentes órganos evaluados. Se seleccionó esta hora ya que en trabajos previos han reportado este punto como el tiempo en donde 6MC presenta la máxima respuesta antiinflamatoria en este modelo (Vergel, 2010).

3.2.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en términos de la media aritmética de los valores obtenidos \pm la desviación estándar respectiva. Para el análisis de los resultados de actividad antiinflamatoria *in vivo* se aplicó la prueba de análisis de varianza a dos vías (ANOVA de dos vías) seguido de un análisis de comparaciones múltiples (prueba de BONFERRONI) usando $p < 0.05$ como nivel de significancia. Para procesar los datos se utilizó el paquete estadístico comercial GrapPad Prism®.

4. Resultados y discusión

4.1 Análisis previo de 6MC

Inicialmente se evaluaron algunas características físicas y químicas de la molécula con el fin de conocer su comportamiento durante el estudio. Se determinó la temperatura de fusión, la solubilidad cualitativa para conocer los solventes que se podían utilizar y la longitud de onda de máxima absorción mediante un barrido en la región del ultravioleta para conocer la longitud de onda para su detección (Figura 4-1) como se resume en la Tabla 4-1.

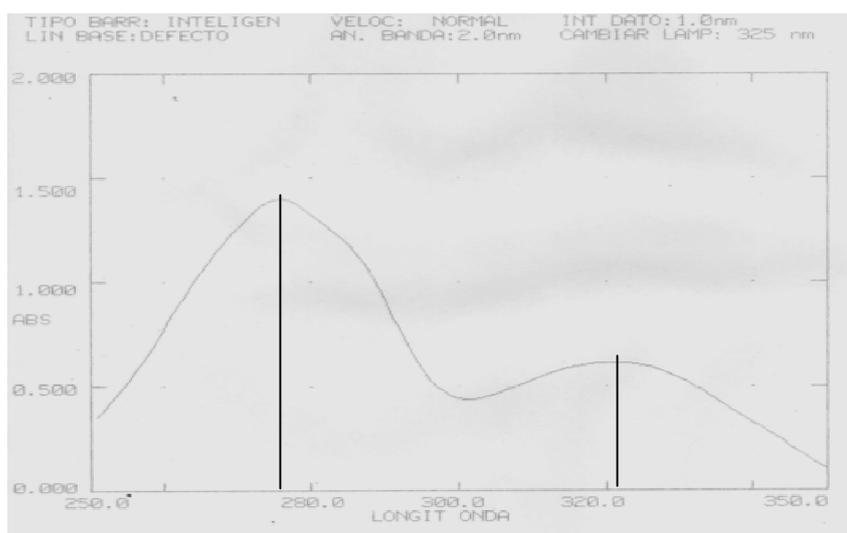
Tabla 4-1: Características fisicoquímicas determinadas experimentalmente para 6MC.

Parámetro	Resultado
Punto de fusión	73 – 76 °C.
Solubilidad en agua (10 mg en 50 mL)	No soluble
Solubilidad en metanol (10 mg en 50 mL)	Soluble
Solubilidad en metanol : agua (50:50) (10 mg en 50 mL)	Soluble
Longitud de onda de máxima absorción	275 nm y 321 nm

Como se observa en la Tabla 4-1 en cuanto a la temperatura de trabajo (que será máximo de 40°C), la molécula no cambiará de estado físico (fusión). Por otro lado, al verificar la baja solubilidad en agua y buena solubilidad en metanol se encontró que era posible hacer una mezcla 1:1 de estos solventes para la preparación de soluciones de trabajo. Finalmente, y como era de esperarse de acuerdo a lo reportado en la literatura (Arango, 2010), 6MC presentó dos longitudes de onda de máxima absorción, una a 275nm atribuida al anillo bencénico y otra a 321nm atribuida al anillo pirónico. En la Figura 4-1 se presenta la respuesta obtenida tras el barrido por el espectro ultravioleta. Es de resaltar que aunque la señal a 275nm es casi el doble de la obtenida a 321nm, no

es menos importante y de hecho no se descarta ya que a dicha longitud de onda, menor número de compuestos generan absorción por lo que se encuentra mayor selectividad, lo que brinda un criterio adicional para la detección de 6MC.

Figura4-1: Espectro de absorción para una solución de 6MC 10 µg/mL en barrido espectrofotométrico entre 250 y 350 nm.



4.2 Desarrollo del método cromatográfico

Durante la puesta en marcha del estudio se evaluaron las condiciones más adecuadas encontrando que:

Tiempo de corrida cromatográfica: 32 minutos.

Flujo: 1 ml / min.

Temperatura de la columna: 40°C.

Volumen de inyección: 50 µL

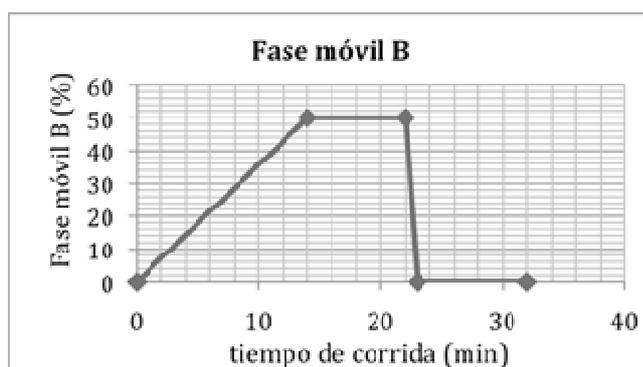
Fase móvil: gradiente lineal entre ambas fases móvilesl (Gráfico 4-1). Al aumentar la cantidad de Fase B (disminuir la polaridad), se obtiene el pico de 6MC y de igual manera

de otras posibles moléculas similares.

Fase móvil A: agua: metanol: ácido acético (95:5:0.2)

Fase móvil B: Metanol: ácido acético (98.8:0.2)

Gráfico 4-1: Gradiente de elución de la fase móvil B para el desarrollo del método de cuantificación de 6MC.



Es importante aclarar que la fase móvil, en cada momento fue preparada y desgasificada por sonicación justo antes de su uso.

Los solventes orgánicos actúan como modificadores de la polaridad para alcanzar separaciones de varios compuestos en una misma corrida, dependiendo del gradiente. El metanol es el modificador orgánico más utilizado en CLAE en mezclas con agua o buffers (Quattrocchi, 1992). También se adecuaron las fases móviles para que presentaran una ligera acidez y así mejorar el desempeño de la separación en fase reversa a través de columnas C-18 (Quattrocchi, 1992). Como se observa en el Gráfico 4-1, el gradiente consiste en un incremento de la proporción de fase orgánica haciendo que disminuya la polaridad progresivamente en los primeros 14 minutos y manteniendo una proporción isocrática durante 9 minutos. Posteriormente regresa a la fase acuosa donde se estabiliza la columna cromatográfica durante los últimos 8 minutos. De esta forma, en la primera etapa se logra hacer migrar los componentes de las muestras en forma descendente de polaridad siendo los últimos (durante la meseta) los compuestos con mayor afinidad por la fase orgánica. Este tipo de fases móviles son ampliamente utilizadas en metodologías analíticas que involucran muestras biológicas del mismo modo que la fase estacionaria de naturaleza apolar C-18 y flujo de 1 mL/min. Por ejemplo, en un estudio realizado en el cual se cuantificó pravastatina en muestras

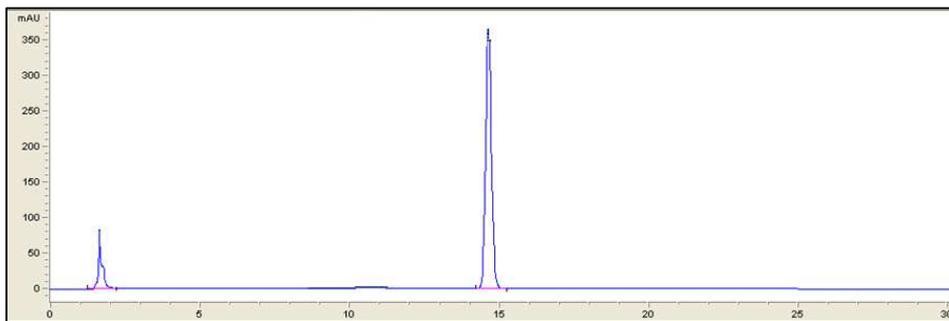
biológicas de ratón FVB, se utilizó como modificador orgánico acetonitrilo en mezcla con agua, aumentando la composición orgánica durante la corrida a un flujo de 1 mL/min. Se utilizó también una columna C-18 que se encuentra apropiada para desarrollar este tipo de separaciones manteniendo la temperatura en 30°C (Sparidans *et al.*, 2010). En cuanto a la temperatura, se observa que la temperatura de 30°C empleada en este estudio, permitió una elución más rápida de los analitos y disminuyó problemas de “tailing” en los picos favoreciendo a su vez la resolución de los mismos. Por este motivo, se decidió aumentar la temperatura de la columna en el estudio realizado, encontrándose que una vez se alcanza una proporción de fase móvil B del 50% y a 40°C en el horno que aloja la fase estacionaria, se produce la separación y por ende se genera el pico cromatográfico (pasando el minuto 14 de la corrida). Del mismo modo, es conveniente resaltar que el tiempo de corrida fue adecuado para lograr una correcta separación de 6MC, teniendo en cuenta que es una molécula de baja polaridad y que su elución se consigue con una mayoritaria proporción de fase orgánica; en consecuencia, las moléculas que poseen una polaridad mayor a ésta se separan primero, generando el pico cromatográfico en la fase inicial de la corrida de naturaleza mayoritariamente acuosa. Es por esta razón que se dejó un aumento gradual de componente orgánico durante un periodo de 14 minutos, donde se esperaba fueran detectadas moléculas de mayor polaridad tales como posibles derivados metabólicos de 6MC que el organismo modifica con el fin de aumentar su polaridad y favorecer la excreción y una vez alcanzado una composición orgánica superior, tuviera lugar la separación de 6MC sin ninguna interferencia. Posteriormente, se permitió una composición constante de fase móvil para favorecer la salida de posibles compuestos con características de baja polaridad y una fase final de lavado en el que se acondiciona el sistema para la corrida siguiente retornando a la composición inicial de fase móvil.

De acuerdo con estudios reportados para otras moléculas, este tiempo de separación es adecuado y comúnmente utilizado en metodologías bioanalíticas por CLAE con manejo de gradientes de elución entre agua y modificadores orgánicos, como es el caso de la cuantificación de paclitaxel en muestras biológicas donde se utilizó como modificador orgánico el acetonitrilo, con un tiempo de corrida de 30 minutos en columna C-18 y un flujo de 1 mL/min, método aplicado a muestras biológicas de ratones SPF C57BLC/6 (Kim *et al.*, 2005).

En la Figura 4-2 se muestra un cromatograma obtenido para 6MC bajo las condiciones

dadas en el desarrollo del método de cuantificación.

Figura 4-2: Cromatograma obtenido para la identificación de 6MC en plasma.



6MC en plasma a 321 nm. Se gráfica área unidades de área $\times 10^{-3}$ (mAU) Vs. Tiempo (min).

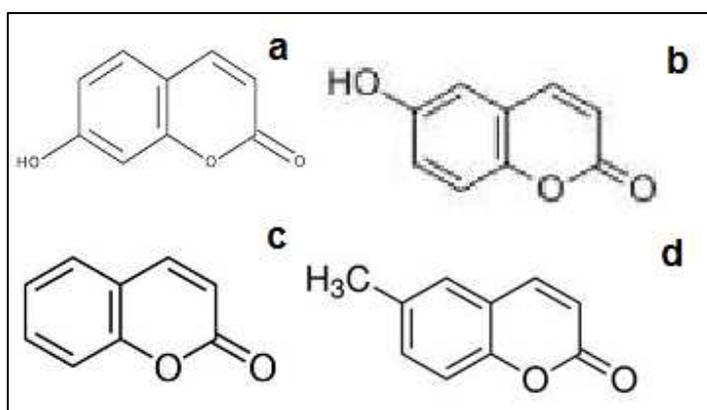
4.3 Validación de la metodología

4.3.1 Idoneidad del sistema

a) Tiempo de retención (tr):

Se evaluó para 6MC y para otras cumarinas de estructura similar, como se ve en la Figura 4-3, con el fin de tener puntos de comparación, obteniendo los tiempos de retención reportados en la Tabla 4-2.

Figura 4-3: Estructura química de cumarinas relacionadas y utilizadas en la validación del método.



a. 7-hidroxicumarina, b. 6- hidroxicumarina, c. cumarina, d. 6 metilcumarina

Tabla 4-2: Tiempos de retención para cada molécula, obtenidos experimentalmente.

Molécula	Tiempo de retención (min)
6 – metilcumarina	14,921
Cumarina	12,091
7- hidroxycumarina	10,751
6 – hidroxycumarina	9,740

b) Factor de capacidad (k):

El factor de capacidad para las cumarinas evaluadas se calculó mediante la Ecuación 4-1 y se reportan en la Tabla 4-3.

Ecuación 4-1: Factor de capacidad (k)

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

donde: t_0 es el tiempo muerto, es decir, el tiempo que tarda en salir un compuesto que no es retenido por la columna en este caso el solvente metanol; t_R es el tiempo de retención del analito.

$$\text{Para 6MC: } k = (14,921 - 1,512) / 1,512 = 8,868$$

Tabla 4-3: Factor de capacidad para cada cumarina empleada para evaluar la idoneidad del sistema.

Molécula	factor de capacidad (k)
6- metil cumarina	8.868
Cumarina	6.997
7- hidroxycumarina	6.110
6 – hidroxycumarina	5.441

El factor de capacidad se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir el compuesto de interés después del volumen inicial contenido en la columna (tiempo muerto); entre más grande sea, más separado del frente de solvente se encuentra. Son adecuados valores de: $2 < k < 10$ (AEFI, 2001). Por lo que el resultado obtenido se encontró dentro de lo esperado para una sistema con buena separación.

c) Retención relativa o factor de separación (α):

La retención relativa o el factor de separación define qué tan selectiva es una columna para separar dos picos; este factor fue calculado mediante la Ecuación 4-2 y los resultados se reportan en la Tabla 4-4.

Ecuación 4-2: Determinación del factor de separación

$$\alpha = \frac{t_{r'(b)} - t_0}{t_{r'(a)} - t_0}$$

donde: $t_{r'(B)}$ es el tiempo de retención para el compuesto B, $t_{r'(A)}$ es el tiempo de retención para el compuesto A y t_0 es el tiempo muerto.

Para 6MC respecto a Cumarina:

$$\alpha \text{ (6MC – Cumarina)} = (14.921 - 1.512) / (12.091 - 1.512) = 2.830$$

Tabla 4-4: Retención relativa (α) para 6MC respecto a otras cumarinas

Analitos	Retención relativa (α)
6MC – cumarina	2.830
6MC – 7- hidroxycumarina	4.170
6MC – 6- hidroxycumarina	5.181

Como vemos, el factor de separación para todas las cumarinas evaluadas fue superior a la unidad (1) indicando que fue adecuada la separación de acuerdo a lo reportado en la literatura (A.E.F.I., 2001).

d) Número de platos teóricos (n)

Este parámetro mide la eficiencia del sistema cromatográfico, expresando el número de picos que pueden aparecer en un cromatograma por unidad de tiempo (A.E.F.I., 2001). El número de platos teóricos se calculó mediante la Ecuación 4-3.

Ecuación 4-3: Número de platos teóricos (n)

$$n = 16 \left(\frac{tr}{W_b} \right)^2 \quad \text{ó} \quad n = 5,54 \left(\frac{tr}{W_{bh}} \right)^2$$

donde: t_r corresponde al tiempo de retención, W_b el ancho de la base, W_{bh} al ancho de la base a media altura.

Para 6MC:

$$n = 5.54(14.921/0.054)^2 = 422978 \text{ platos teóricos}$$

Para el número de platos teóricos son recomendados valores por encima de 2000 (A.E.F.I., 2001), por lo que podemos decir que el sistema evaluado tiene una buena eficiencia.

e) Altura equivalente del plato teórico (H):

La altura de plato está relacionada con la eficiencia ya que un sistema es más eficiente entre mayor sea el número de platos teóricos y menor sea la altura de éstos (A.E.F.I., 2001). La altura de los platos se calculó mediante la Ecuación 4-4.

Ecuación 4-4: Altura equivalente de plato teórico (H)

$$H = \frac{l}{n}$$

donde: l es la longitud de la columna; y n es el número de platos teóricos

Para 6MC:

$$H = 15 / 422978 = 3.55e^{-5} \text{ cm}$$

El valor de $3.55e^{-5}$ cm se considera bajo, lo que sumado al gran valor de platos teóricos confirmó la adecuada eficiencia del sistema utilizado.

f) Resolución (R)

La resolución es la medida de separación entre dos picos y se calculó mediante la ecuación 4-5.

Ecuación 4-5: Resolución (R)

$$R = \frac{2\Delta t}{W_1 + W_2}$$

donde: Δt es el la diferencia de tiempos de retención entre dos picos; y W_1 ancho de base a media altura del pico 1; y W_2 ancho de base a media altura del pico 2.

Para 6MC respecto a cumarina:

$$R_{(6MC\text{-cumarina})} = 2 * 2.83 / (0.054 + 0.051) = 53.904$$

La resolución de un sistema se considera adecuada con valores superiores a 2. Por lo tanto, encontramos que la resolución del sistema para 6MC frente a un pico cercano fue apropiada para su correcta determinación.

g) Factor de asimetría o “tailing”:

Este factor es calculado por el software (Ecuación 4-6) del equipo cromatográfico debido a que se necesitaría una resolución gráfica aceptable del cromatograma para calcular el ancho de pico al 5% o 10% de altura y por tanto el factor (f).

Ecuación 4-6: Factor de asimetría (T)

$$T = \frac{W_{0,05 \text{ ó } 0,1}}{2f}$$

donde: $W_{0,05 \text{ ó } 0,1}$ es el ancho de pico a un 5 o 10% de la altura y f es la medida entre el punto en la abscisa medido por el ancho de pico y el tiempo de retención.

$$T_{6MC} = 0.96.$$

Dicho factor mide la asimetría de la señal generada por el analito (A.E.F.I., 2001). Un pico perfectamente simétrico tendrá un $T = 1$, si presenta un ensanchamiento al inicio del pico tendrá valores inferiores a la unidad mientras que si presenta cola tendrá un valor por encima de la unidad. Se considera adecuado un valor entre 0.8 y 1.5. De acuerdo a esto, el sistema fue adecuado para obtener picos de 6MC con buena simetría.

Los resultados obtenidos en esta primera etapa cumplen con los parámetros establecidos por la FDA (FDA, 2001) en los lineamientos para la validación de métodos analíticos. Por tal razón, el sistema cromatográfico es idóneo y se puede utilizar para la validación de las metodologías y el análisis del compuesto de interés 6MC.

4.3.2 Parámetros de validación

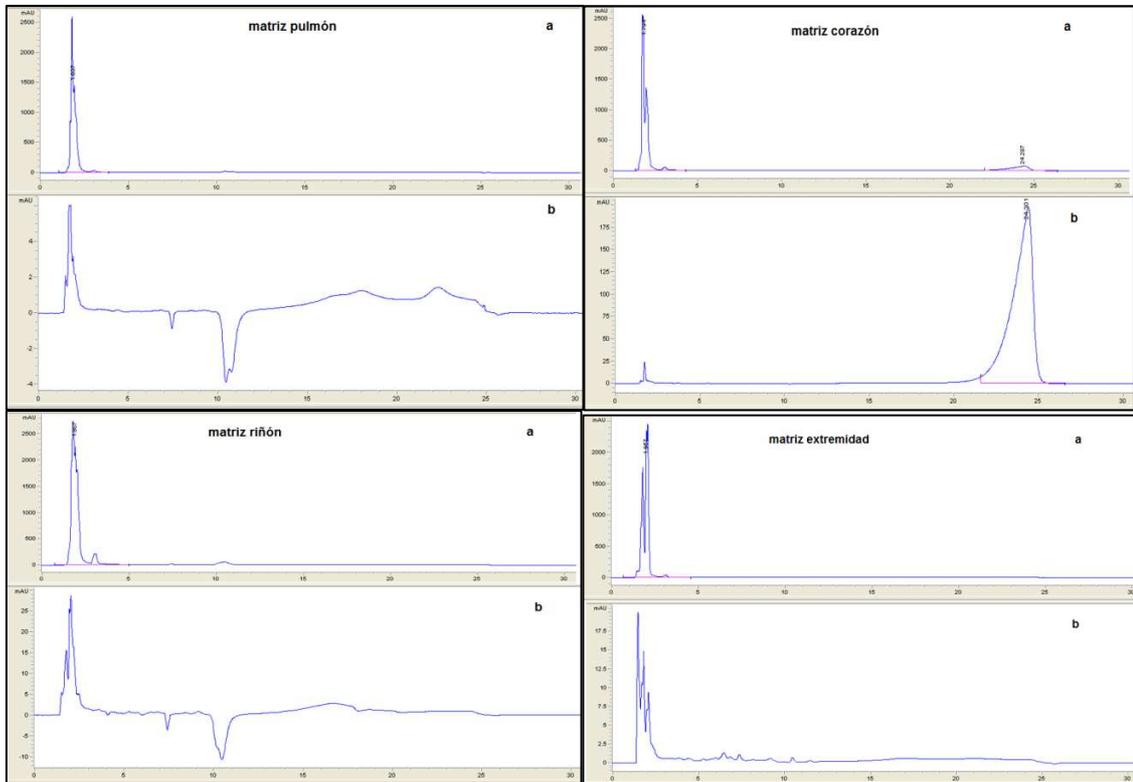
a. Selectividad y especificidad

Cuando se quiere cuantificar alguna molécula presente en matrices biológicas complejas, uno de los principales retos en el desarrollo y validación del método cromatográfico es lograr que éste sea específico por la posibilidad de encontrar más moléculas de

características similares, y que sea selectivo, comprobando que los componentes endógenos de la matriz no generan ninguna interferencia con la molécula de interés. Para la evaluación de selectividad, en el sistema (metanol) se hicieron lecturas de 10 blancos (metanol sólo) y no se observaron interferencias en el tiempo de retención de 6MC. Así mismo, se evaluó cada una de las matrices (hígado, bazo, corazón pulmones, riñones, plasma, extremidad) y en ninguna se encontró interferencias en el mismo tiempo de retención de 6MC como se observa en la Figura 4-4.

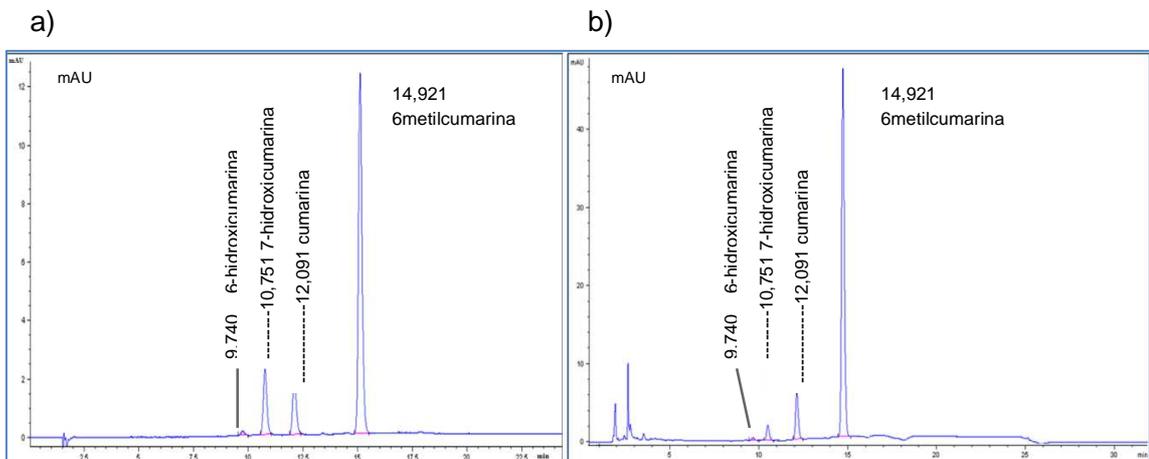
Para la especificidad, frente a otros analitos contemplados como posibles interferentes, usamos como ejemplo cumarina, 6 hidroxycumarina, 7 hidroxycumarina, se evaluó respecto a su tiempo de retención descritos previamente, para asegurar que no eluyeran al mismo tiempo de retención de 6MC. En los cromatogramas no se presentaron interferencias entre las respuestas para cada pico. Como se observa en la Figura 4-5, 6MC no presenta inconvenientes en su detección ya que ni con otros analitos ni con componentes endógenos de la matriz en este ejemplo hígado, presenta interferencia. Los picos fueron agudos, claramente definidos y adecuadamente separados como se observa en la Figura 4-6. Se evaluó para todas las matrices a usar encontrándose el mismo comportamiento. Así pues, es posible inferir que el método cumple con los parámetros de selectividad y especificidad necesarios para la cuantificación de 6MC en las matrices biológicas que fueron contempladas en el presente estudio.

Figura 4-4: Cromatogramas de la evaluación de especificidad del método frente a los componentes endógenos de la matriz.



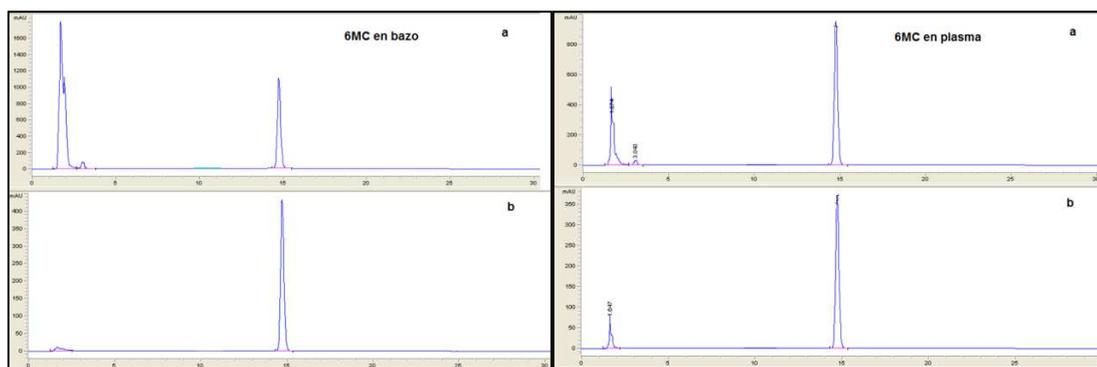
Muestras de matriz pulmones, corazón, riñones y extremidad a. 321 nm b. 275 nm. Se grafica unidades de área $\cdot 10^{-3}$ (mAU) Vs. Tiempo (min).

Figura 4-5: Evaluación de la selectividad del método frente a otros compuestos similares.



Ejemplo en a) sistema metanol B) matriz hígado. Longitud de onda: 321nm. Se grafica unidades de área $\cdot 10^{-3}$ (mAU) Vs. Tiempo (min).

Figura 4-6: Cromatogramas de la evaluación de especificidad del método frente a componentes endógenos de la matriz en muestras enriquecidas con 6MC.



Muestras de bazo y plasma enriquecidas con 6MC. a. 321nm b. 275nm. Se grafica unidades de área $\cdot 10^{-3}$ (mAU) Vs. Tiempo (min).

b. Límite de cuantificación

Para su determinación se usaron triplicados de cada una de las concentraciones alcanzadas obteniéndose la concentración más baja que fue posible calcular con adecuada precisión y exactitud como se observa en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5: Límite de cuantificación (LOQ) para cada matriz.

Parámetro	Corazón		Bazo		Pulmones		Riñones		Hígado		Extremidad		Plasma	
	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm
LOQ $\mu\text{g/mL}$	0.20	0.20	0.30	0.30	0.30	0.30	0.40	0.30	0.40	0.30	0.15	0.08	0.30	0.30
Concentraciones calculadas $\mu\text{g/mL}$	0.17	0.20	0.25	0.27	0.25	0.25	0.34	0.33	0.42	0.28	0.14	0.08	0.34	0.29
	0.17	0.19	0.25	0.27	0.25	0.25	0.34	0.31	0.43	0.33	0.14	0.09	0.34	0.29
	0.18	0.21	0.25	0.27	0.26	0.25	0.37	0.33	0.42	0.29	0.14	0.08	0.34	0.29
CV %	2.94	4.15	0.27	0.00	1.96	0.76	5.34	3.41	0.53	8.50	1.33	3.70	0.63	1.24
ER%	14.03 \pm 2.53	3.50 \pm 1.01	15.25 \pm 0.22	9.90 \pm 0.00	14.1 \pm 1.68	16.01 \pm 0.64	12.65 \pm 4.67	8.80 \pm 3.71	5.97 \pm 0.56	6.39 \pm 3.33	6.38 \pm 1.24	2.51 \pm 1.02	12.80 \pm 0.71	3.35 \pm 1.21

CV: Coeficiente de Variación; ER: Error Relativo. Se tomaron los primeros 2 decimales para presentar el resultado, el cálculo se hizo teniendo en cuenta todos los decimales.

Debido a la complejidad de las matrices usadas en métodos bioanalíticos, la evaluación del límite de cuantificación es fundamental en los estudios de biodistribución ya que varía de acuerdo a la matriz estudiada, a la especie escogida y no es posible generalizar su valor hasta no ser demostrado. De acuerdo a lo obtenido y los parámetros de aceptación descritos previamente, se encontró que hasta la concentración reportada en la Tabla 4-5 para cada órgano (matriz) y en cada longitud de onda evaluada fue donde se alcanzó una precisión y exactitud inferior al 20% que es lo admitido por las guías de ICH (ICH, 2005). Precisión expresada en términos del coeficiente de variación (CV%) y exactitud en términos de error relativo (ER%) en general, se obtuvo un CV% < 8% y un ER% < 16% en todos los casos. Por lo tanto, concretamente se encontró una mínima concentración cuantificable en corazón de 0.2 µg/mL a ambas longitudes de onda. Para bazo, pulmón y plasma dicha concentración fue 0.30 µg/mL a ambas longitudes. En el caso de hígado y riñón a 321 nm se mantiene la concentración mínima en 0.30 µg/mL aunque se encontró que a 275nm el método mantiene su exactitud y precisión hasta 0,40 µg/mL teniéndose que son las matrices más complejas para su estudio. Por el contrario, para extremidad se encontró que el método mantenía sus características de aceptación a concentraciones inferiores, incluso hasta 0.08 µg/mL lo que confirma que sus características endógenas son irrelevantes en la lectura a las longitudes de onda estudiadas. Estos valores encontrados fueron similares a los reportados por otros autores para estudios de farmacocinética y biodistribución como el realizado con orientina en ratas Sprague – Dawley en donde el límite de cuantificación fue de 0.2 µg/mL en plasma, 0.5 µg/mL en pulmones y 0.05 µg/mL en otros tejidos (Li *et al.*, 2008).

c. Linealidad

Para determinar la linealidad de 6MC en el sistema y en cada una de las matrices estudiadas, se trabajó por triplicado, a 5 niveles de concentración obteniendo los resultados reportados en las Tablas 4-6 a 4-9 y en las Gráficas 4-2 a 4-9.

✓ **Sistema: Metanol: agua (50:50)**

Tabla 4-6: Evaluación de linealidad en el sistema.

Concentración 6MC $\mu\text{g/ml}$	Area mAU 275 nm	Area mAU 321 nm
0.4	109.2	41.1
	123.1	46.3
	117.9	49.3
0.8	258.6	97.4
	259.7	97.6
	250.2	97.8
1.6	505.8	185.4
	504.0	189.9
	507.7	198.5
3.2	1036.4	390.8
	993.1	406.0
	949.8	358.2
6.4	1823.9	689.2
	1872.2	570.1
	1920.5	725.3
12.8	3983.4	1508.4
	4030.2	1525.9
	3706.3	1372.2

Sistema: metanol-agua (50:50). Concentración utilizada en $\mu\text{g/mL}$ y la respuesta obtenida en el cromatógrafo área en mAU para 275nm y 321nm.

Tabla 4-7: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el sistema.

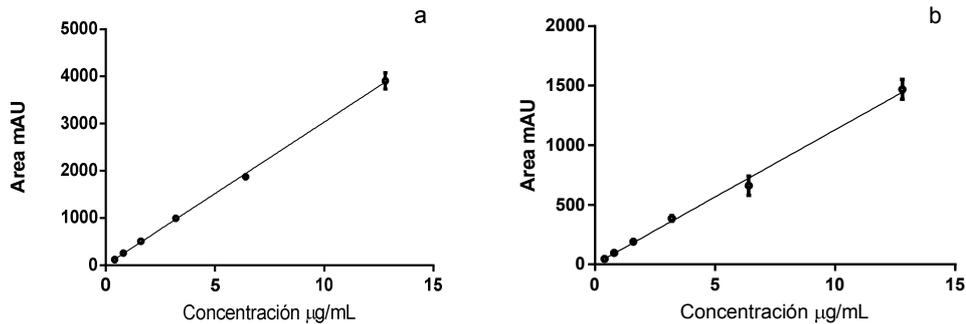
Parámetro	Valor 275 nm	Valor 321 nm	desviación estándar 275nm	desviación estándar 321nm	hipótesis nula	hipótesis alterna	t exp 275nm	t exp 321nm	t tab (16; 0,05)
Intercepto (a)	2.986	1.084	24.518	17.159	$H_0: \alpha = 0$	$H_1: \alpha \neq 0$	0.122	0.063	2.120
Pendiente (b)	302.888	112.829	4.064	2.844	$H_0: \beta = 0$	$H_1: \beta \neq 0$	74.533	39.672	2.120
Correlación (r)	0.999	0.995	--	--	$H_0: r = 0$	$H_1: r \neq 0$	74.533	39.672	2.120

Resultados para ambas longitudes de onda.

Tabla 4-8: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el sistema.

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Sumatoria de cuadrados (SC) 275nm	Sumatoria de cuadrados (SC) 321nm	Cuadrado medio (CM) 275nm	Cuadrado medio (CM) 321nm	F exp 275nm	F exp 321nm	F tabulado
Regresión	1	30979136.32	4298810.09	30979057.57	4298810.09	5555.21	1573.90	4.49 (1, 16, 0.05)
Error	16	89223.34	43700.89	5576.57	2731.31			
Desvío de linealidad	4	2229.55	15815.84	5574.88	3953.96	0.99	1.70	3.26 (4, 12, 0.05)
Error puro	12	69870.34	27885.05	5576.98	2323.75			
Total	17	31068359.66	4342510.98					

Resultados para ambas longitudes de onda.

Gráfico 4-2: Curvas de calibración para 6MC en el sistema (metanol – agua)

a. 275 nm y b. 321nm. Datos Expresados como el promedio \pm desviación estándar.

✓ **Método 1: HIGADO****Tabla 4-9:** Evaluación de linealidad en el método 1: Hígado.

Concentración 6MC µg/ml	Area mAU 275 nm	Area mAU 321 nm
0.4	51.4	22.4
	53.8	24.2
	56.1	26.4
0.8	118.5	39.0
	113.3	35.0
	110.6	40.0
1.6	245.1	89.2
	228.4	85.0
	216.8	87.7
3.2	403.5	147.5
	507.4	123.6
	499.5	115.2
6.4	868.3	280.0
	848.1	244.0
	827.9	256.0
12.8	1622.7	548.2
	1667.4	580.0
	1712.1	528.9

Concentración utilizada en µg/mL y la respuesta obtenida en el cromatógrafo área en mAU para 275nm y 321nm.

Tabla 4-10: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el método 1: hígado.

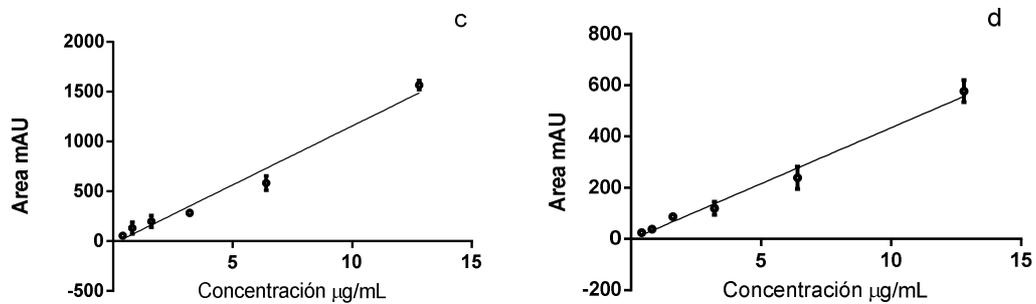
Parámetro	Valor 275nm	Valor 321nm	desviación estándar 275nm	desviación estándar 321nm	hipótesis nula	hipótesis alterna	t exp 275nm	t exp 321nm	t tab (16; 0,05)
Intercepto (a)	21.221	4.744	10.809	5.498	Ho: $\alpha = 0$	H1: $\alpha \neq 0$	1.963	0.863	2.120
Pendiente (b)	129.218	42.155	1.791	0.911	Ho: $\beta = 0$	H1: $\beta \neq 0$	72.128	46.260	2.120
correlación (r)	0.998	0.996	--	--	Ho: $r = 0$	H1: $r \neq 0$	72.128	46.260	2.120

Resultados para ambas longitudes de onda.

Tabla 4-11: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 1: hígado.

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Sumatoria de cuadrados (SC) 275nm	Sumatoria de cuadrados (SC) 321nm	Cuadrado medio (CM) 275nm	Cuadrado medio (CM) 321nm	F exp 275nm	F exp 321nm	F tabulado
Regresión	1	5638329.97	600065.45	5638329.97	600065.45	5202.51	2139.95	4.49 (1, 16, 0.05)
Error	16	17340.33	4486.58	1083.77	280.41			
desvío de linealidad	4	6387.84	1898.84	1596.96	474.71	1.75	2.20	3.26 (4, 12, 0.05)
Error puro	12	10952.49	2587.74	912.71	215.64			
Total	17	5655670.30	604552.03					

Resultados para ambas longitudes de onda.

Gráfico 4-3: Curva de calibración para 6MC en el método 1: hígado.c) 275nm y d) 321nm. Datos Expresados como el promedio \pm desviación estándar.

✓ **Método 2: PULMONES****Tabla 4-12:** Evaluación de linealidad en el método 2: pulmones.

Concentración 6MC µg/ml	Area mAU 275 nm	Area mAU 321 nm
0.4	50.0	15.0
	43.1	12.0
	45.0	17.0
0.8	91.8	34.2
	78.0	29.3
	88.9	33.3
1.6	201.5	74.8
	198.8	73.7
	177.1	65.3
3.2	406.9	151.4
	399.2	148.5
	448.1	166.6
6.4	758.3	352.5
	792.5	295.1
	853.3	307.8
12.8	1808.5	685.9
	1672.2	624.9
	1770.0	660.1

Concentración utilizada en µg/mL y la respuesta obtenida en el cromatógrafo área en mAU para 275nm y 321nm.

Tabla 4-13: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el método 2: pulmones.

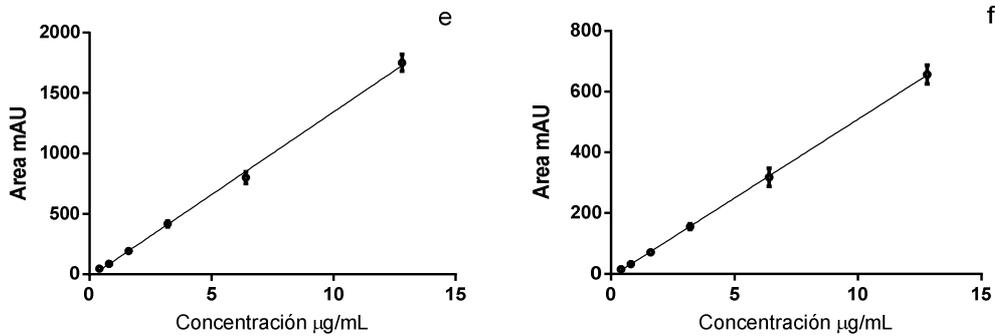
Parámetro	Valor 275nm	Valor 321nm	desviación estándar 275nm	desviación estándar 321nm	hipótesis nula	hipótesis alterna	t exp 275nm	t exp 321nm	t tab (16; 0,05)
Intercepto (a)	-26.620	-9.882	13.299	5.244	Ho: $\alpha = 0$	H1: $\alpha \neq 0$	-2.002	-1.885	2.120
Pendiente (b)	137.068	51.922	2.204	0.869	Ho: $\beta = 0$	H1: $\beta \neq 0$	62.184	59.738	2.120
correlación (r)	0.998	0.998	--	--	Ho: $r = 0$	H1: $r \neq 0$	62.184	59.738	2.120

Resultados para ambas longitudes de onda.

Tabla 4-14: Parámetros estadísticos ANOVA Y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 2: pulmones.

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Sumatoria de cuadrados (SC) 275nm	Sumatoria de cuadrados (SC)321nm	Cuadrado medio (CM) 275nm	Cuadrado medio (CM) 321nm	F exp 275nm	F exp 321nm	F tabulado
Regresión	1	6344241.42	910339.03	6344241.42	910339.03	3866.81	3568.67	4.49 (1, 16, 0.05)
Error	16	26251.04	4081.47	1640.69	255.09			
Desvío de linealidad	4	9873.90	537.46	2892.85	134.37	2.36	0.45	3.26 (4, 12, 0.05)
Error puro	12	16377.14	3544.00	1223.30	295.33			
Total	17	6370492.46	914420.50					

Resultados para ambas longitudes de onda.

Gráfico 4-4: Curva de calibración para 6MC en el método 2: pulmones.e. 275 nm y f. 321 nm. Datos Expresados como el promedio \pm desviación estándar.

✓ **Método 3: BAZO****Tabla 4-15:** Evaluación de linealidad en el método 3: bazo.

Concentración µg/ml	Area mAU 275nm	Area mAU 321nm
0.4	42.0	12.5
	36.2	13.6
	49.0	18.4
0.8	88.1	33.4
	101.1	37.8
	96.6	36.1
1.6	213.6	80.3
	208.2	78.4
	198.6	67.6
3.2	459.9	172.8
	461.8	174.5
	466.3	177.2
6.4	814.1	305.3
	873.3	325.9
	939.7	350.9
12.8	1968.0	774.3
	1840.5	688.2
	1855.5	693.8

Concentración utilizada en µg/mL y la respuesta obtenida en el cromatógrafo área en mAU para 275nm y 321nm.

Tabla 4-16: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el método 3: bazo.

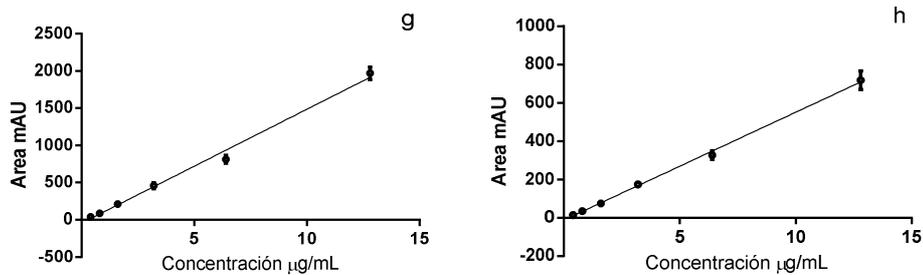
Parámetro	Valor 275nm	Valor 321nm	desviación estándar 275nm	desviación estándar 321nm	hipótesis nula	hipótesis alterna	t exp 275nm	t exp 321nm	t tab (16; 0,05)
Intercepto (a)	-27.173	-12.540	13.304	7.188	Ho: $\alpha = 0$	H1: $\alpha \neq 0$	-2.042	-1.745	2.120
Pendiente (b)	148.170	56.438	2.205	1.191	Ho: $\beta = 0$	H1: $\beta \neq 0$	67.193	47.372	2.120
correlación (r)	0.998	0.996	--	--	Ho: $r = 0$	H1: $r \neq 0$	67.193	47.372	2.120

Resultados para ambas longitudes de onda.

Tabla 4-17: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 3: bazo.

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Sumatoria de cuadrados (SC) 275nm	Sumatoria de cuadrados (SC)321nm	Cuadrado medio (CM) 275nm	Cuadrado medio (CM) 321nm	F exp 275nm	F exp 321nm	F tabulado
Regresión	1	7413501.39	1075596.32	7413501.39	1075596.32	4514.84	2244.10	4.49 (1, 16, 0.05)
Error	16	26272.47	7668.78	1642.03	479.30			
Desvío de linealidad	4	8357.28	1851.04	2889.32	848.25	2.36	2.38	3.26 (4, 12, 0.05)
Error puro	12	17915.19	5817.74	1226.26	356.31			
Total	17	7439773.86	1083265.10					

Resultados para ambas longitudes de onda.

Gráfico 4-5: Curva de calibración para 6MC en el método 3: bazo.g. 275 nm. h. 321 nm. Datos Expresados como el promedio \pm desviación estándar.

✓ **Método 4: CORAZÓN****Tabla 4-18:** Evaluación de linealidad en el método 4: corazón.

Concentración 6MC µg/ml	Area mAU 275 nm	Area mAU 321 nm
0.4	72.7	20.1
	48.0	17.0
	43.1	17.9
0.8	114.0	36.0
	107.9	32.6
	121.5	39.0
1.6	220.9	75.3
	226.2	76.7
	233.2	78.5
3.2	522.0	196.0
	562.0	200.0
	405.0	149.9
6.4	865.7	321.0
	880.0	321.5
	903.0	329.0
12.8	1704.0	653.0
	1710.0	631.0
	1669.5	616.9

Concentración utilizada en µg/mL y la respuesta obtenida en el cromatógrafo área en mAU para 275nm y 321nm.

Tabla 4-19: Parámetros estadísticos “t” student para la linealidad de 6MC en el método 4: corazón.

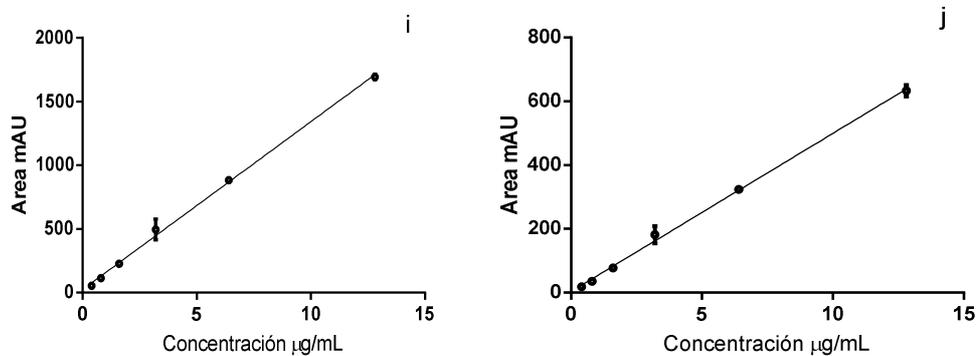
Parámetro	Valor 275nm	Valor 321nm	desviación estándar 275nm	desviación estándar 321nm	hipótesis nula	hipótesis alterna	t exp 275nm	t exp 321nm	t tab (16; 0,05)
Intercepto (a)	24.810	3.225	13.532	5.119	Ho: $\alpha = 0$	H1: $\alpha \neq 0$	1.833	0.630	2.120
Pendiente (b)	131.774	49.648	2.243	0.848	Ho: $\beta = 0$	H1: $\beta \neq 0$	58.750	58.514	2.120
correlación (r)	0.998	0.998	--	--	Ho: $r = 0$	H1: $r \neq 0$	58.750	58.514	2.120

Resultados para ambas longitudes de onda.

Tabla 4-20: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 4: corazón.

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Sumatoria de cuadrados (SC) 275nm	Sumatoria de cuadrados (SC)321nm	Cuadrado medio (CM) 275nm	Cuadrado medio (CM) 321nm	F exp 275nm	F exp 321nm	F tabulado
Regresión	1	5863610.36	832341.94	5863610.36	832341.94	3451.59	3423.89	4.49 (1, 16, 0.05)
Error	16	27181.00	3889.57	1698.81	243.10			
Desvio de linealidad	4	11532.22	1606.25	2894.34	448.45	2.23	2.57	3.26 (4, 12, 0.05)
Error puro	12	15648.78	2283.32	1300.30	174.65			
Total	17	5890791.36	836231.50					

Resultados para ambas longitudes de onda.

Gráfico 4-6: Curva de calibración para 6MC en el método 4: corazón.

i. 275 nm y j. 321 nm. Datos Expresados como el promedio ± desviación estándar.

✓ **Método 5: EXTREMIDAD****Tabla 4-21:** Evaluación de linealidad en el método 5: extremidad.

Concentración 6MC µg/ml	Area mAU 275 nm	Area mAU 321 nm
0.4	47.1	12.8
	68.4	19.4
	54.8	20.8
0.8	103.3	39.6
	155.2	38.5
	92.9	36.5
1.6	181.0	69.8
	191.6	74.5
	181.2	70.7
3.2	474.3	180.2
	417.0	160.0
	443.3	168.0
6.4	876.0	292.3
	839.5	315.7
	915.7	347.7
12,8	1854.4	670.0
	1700.9	637.7
	1617.8	606.8

Concentración utilizada en µg/mL y la respuesta obtenida en el cromatógrafo área en mAU para 275nm y 321nm.

Tabla 4-22: Parámetros estadísticos “t” Student para la linealidad de 6MC en el método 5: extremidad.

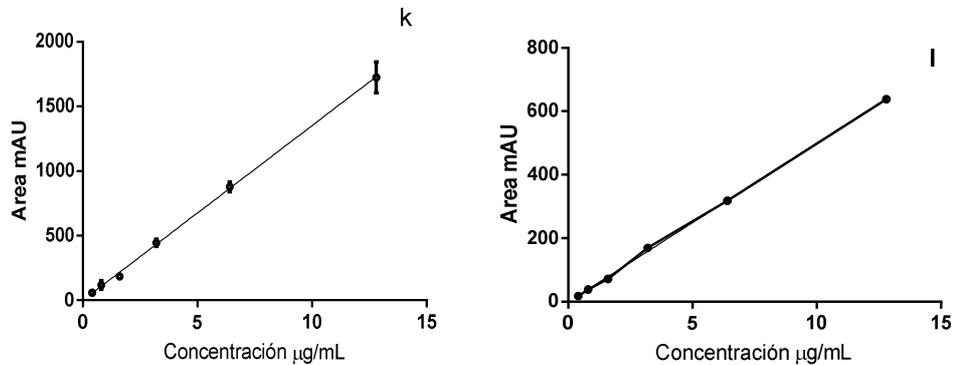
Parámetro	Valor 275nm	Valor 321nm	desviación estándar 275nm	desviación estándar 321nm	hipótesis nula	hipótesis alterna	t exp 275nm	t exp 321nm	t tab (16; 0,05)
Intercepto (a)	-0.455	-1.367	16.449	5.382	Ho: $\alpha = 0$	H1: $\alpha \neq 0$	-0.028	-0.254	2.120
Pendiente (b)	135.219	50.074	2.276	0.892	Ho: $\beta = 0$	H1: $\beta \neq 0$	49.597	56.136	2.120
correlación (r)	0.997	0.997	--	--	Ho: $r = 0$	H1: $r \neq 0$	56.136	49.597	2.120

Resultados para ambas longitudes de onda.

Tabla 4-23: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 5: extremidad.

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Sumatoria de cuadrados (SC) 275nm	Sumatoria de cuadrados (SC) 321nm	Cuadrado medio (CM) 275nm	Cuadrado medio (CM) 321nm	F exp 275nm	F exp 321nm	F tabulado
Regresión	1	6174246.67	846701.85	6174246.67	846701.85	2459.90	3151.24	4.49 (1, 16, 0.05)
Error	16	40159.29	4299.01	2509.96	268.69			
Desvio de linealidad	4	4259.38	493.81	3178.43	250.12	1.39	0.91	3.26 (4, 12, 0.05)
Error puro	12	35899.91	3805.21	2287.13	274.88			
Total	17	6214405.96	851000.86					

Resultados para ambas longitudes de onda.

Gráfico 4-7: Curva de calibración para 6MC en el método 5: extremidad.k. 275 nm y l. 321 nm. Datos expresados como el promedio \pm desviación estándar.

✓ **Método 6: RIÑONES****Tabla 4-24:** Evaluación de linealidad en el método 6: riñones.

Concentración 6MC µg/ml	Area mAU 275 nm	Area mAU 321 nm
0.4	67.2	25.7
	66.5	26.1
	55.4	22.3
0.8	107.4	46.7
	91.5	33.7
	90.7	40.2
1.6	185.9	69.2
	196.5	73.0
	209.0	77.7
3.2	390.5	144.7
	365.8	136.5
	423.5	158.5
6.4	793.6	302.9
	755.8	284.1
	831.3	321.6
12.8	1471.3	662.9
	1501.2	635.9
	1445.3	608.8

Concentración utilizada en µg/mL y la respuesta obtenida en el cromatógrafo área en mAU para 275nm y 321nm.

Tabla 4-25: Parámetros estadísticos “t” Student para la linealidad de 6MC en el método 6: riñones.

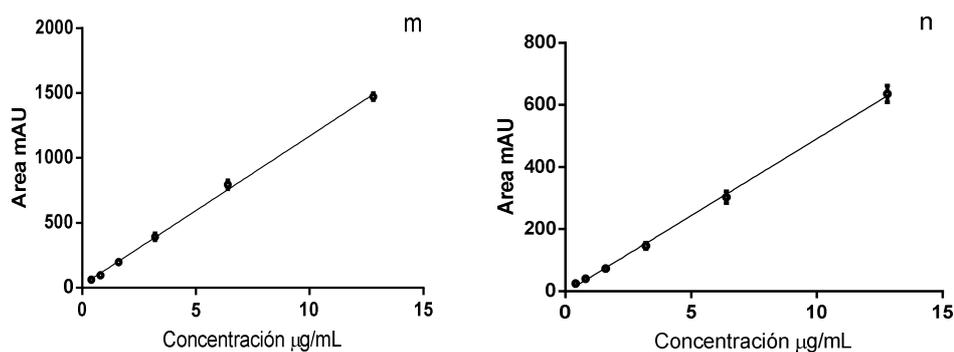
Parámetro	Valor 275nm	Valor 321nm	desviación estándar 275nm	desviación estándar 321nm	hipótesis nula	hipótesis alterna	t exp 275nm	t exp 321nm	t tab (16; 0,05)
Intercepto (a)	19.977	-3.809	9.340	4.823	Ho: $\alpha = 0$	H1: $\alpha \neq 0$	2.139	-0.790	2.120
Pendiente (b)	114.931	49.457	1.548	0.799	Ho: $\beta = 0$	H1: $\beta \neq 0$	74.241	61.866	2.120
correlación (r)	0.999	0.998	--	--	Ho: $r = 0$	H1: $r \neq 0$	74.241	61.866	2.120

Resultados para ambas longitudes de onda.

Tabla 4-26: Parámetros estadísticos ANOVA y FISHER para la linealidad de 6MC en el método 6: riñones.

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Sumatoria de cuadrados (SC) 275nm	Sumatoria de cuadrados (SC) 321nm	Cuadrado medio (CM) 275nm	Cuadrado medio (CM) 321nm	F exp 275nm	F exp 321nm	F tabulado
Regresión	1	4460449.11	825967.52	4460449.11	825967.52	5511.78	3827.43	4.49 (1, 16, 0.05)
Error	16	12948.11	3452.83	809.26	215.80			
Desvio de linealidad	4	6324.42	909.60	1581.11	318.67	2.86	1.76	3.26 (4, 12, 0.05)
Error puro	12	6623.69	2543.24	551.97	181.49			
Total	17	4473397.23	829420.35					

Resultados para ambas longitudes de onda.

Gráfico 4-8: Curva de calibración para 6MC en el método 6: riñones.

m. 275 nm y n. 321nm. Datos expresados como el promedio \pm desviación estándar.

✓ **Método 7: PLASMA****Tabla 4-27:** Evaluación de linealidad en el método 7: plasma.

Concentración 6MC µg/ml	Area mAU 275 nm	Area mAU 321 nm
0.4	88.3	32.1
	88.4	32.0
	87.1	31.7
0.8	164.3	61.5
	155.8	50.9
	161.1	50.7
1.6	350.1	97.5
	324.2	110.4
	274.7	106.1
3.2	737.9	203.4
	709.2	230.1
	650.8	237.3
6.4	1503.5	462.4
	1497.6	460.7
	1500.6	461.6
12.8	3057.6	848.6
	3032.7	900.6
	3007.7	890.7

Concentración utilizada en µg/mL y la respuesta obtenida en el cromatógrafo área en mAU para 275nm y 321nm.

Tabla 4-28: Parámetros estadísticos "t" Student para la linealidad de 6MC en el método 7: plasma.

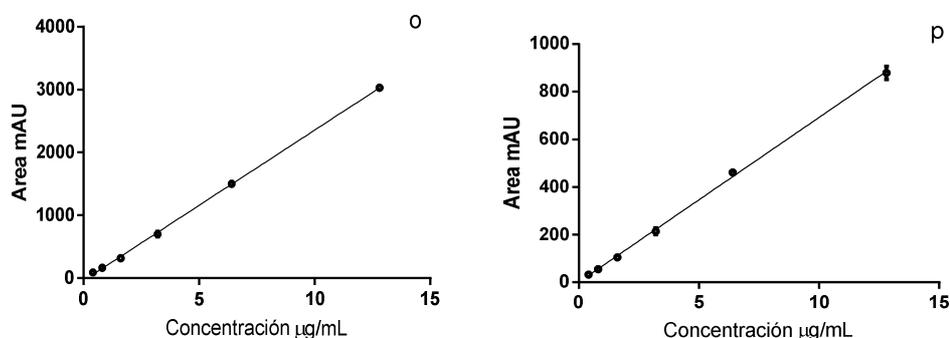
Parámetro	Valor 275nm	Valor 321nm	desviación estándar 275nm	desviación estándar 321nm	hipótesis nula	hipótesis alterna	t exp 275nm	t exp 321nm	t tab (16; 0,05)
Intercepto (a)	-40.549	0.234	10.443	4.911	Ho: $\alpha = 0$	H1: $\alpha \neq 0$	-3.883	0.476	2.120
Pendiente (b)	239.701	69.129	1.731	0.814	Ho: $\beta = 0$	H1: $\beta \neq 0$	138.476	84.930	2.120
correlación (r)	0.999	0.999	--	--	Ho: $r = 0$	H1: $r \neq 0$	138.476	84.930	2.120

Resultados para ambas longitudes de onda.

Tabla 4-29: Parámetros estadísticos para la linealidad de 6MC en el método 7: plasma.

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Sumatoria de cuadrados (SC) 275nm	Sumatoria de cuadrados (SC) 321nm	Cuadrado medio (CM) 275nm	Cuadrado medio (CM) 321nm	F exp 275nm	F exp 321nm	F tabulado
Regresión	1	19401908.62	1613741.79	19401908.62	1613741.79	19175.74	7213.16	4.49 (1, 16, 0.05)
Error	16	16188.71	3579.55	1011.79	223.72			
Desvio de linealidad	4	8012.77	1744.52	2081.20	436.13	2.94	2.85	3.26 (4, 12, 0.05)
Error puro	12	8175.94	1835.01	655.42	152.92			
Total	17	19418097.33	1617321.34					

Resultados para ambas longitudes de onda.

Gráfico 4-9: Curva de calibración para 6MC en el método 7: plasma.

o. 275 nm y p. 321 nm. Datos Expresados como el promedio \pm desviación estándar.

La evaluación de la linealidad es uno de los procedimientos estadísticos más útiles e importantes en los estudios de validación, de este depende la correcta relación entre la respuesta que se busca y la concentración que se desea encontrar. Como se observa anteriormente, el coeficiente de correlación en todos los casos fue mayor a 0,997 confirmando que existe una correlación entre la concentración y la respuesta del equipo cromatográfico en términos de área bajo la curva dentro del rango estudiado. Dicho

rango fue adecuado teniendo en cuenta la concentración empleada para los ensayos de biodistribución, como han sido utilizados en trabajos previos en donde se evaluó la biodistribución de orientina utilizando CLAE con detección UV 380nm para su determinación en el rango de 0,25 a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Li *et al.*, 2008). También, el rango utilizado en la determinación de paclitaxel en muestras biológicas donde se utilizó CLAE con detección UV de 227 nm el rango de linealidad fue entre 0,1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ (Kim *et al.*, 2005). Posteriormente se determinó el estadístico “t” de Student para el coeficiente de correlación (r), la pendiente (b) y el intercepto (a) con el fin de verificar la linealidad. En todos los casos el t experimental para el intercepto fue menor que el t tabulado por lo que no fue posible rechazar la hipótesis nula, afirmando que la recta presenta un intercepto con el eje Y que no es significativamente diferente de cero, existiendo una convergencia al origen. Para (r) y (b) en todos los casos se obtuvo que el t experimental fue mayor al t tabulado por lo que se rechaza la hipótesis nula afirmando que si son estadísticamente diferentes de cero y existe una correlación significativa entre las dos variables, concentración (X) y área bajo la curva (Y) con un nivel de confiabilidad del 95%.

Finalmente, corroborando mediante un ANOVA y estadístico de Fisher se encontró en todos los casos para la regresión que F experimental fue mayor al F tabulado lo que indica que sí existe una regresión significativa y para el caso del desvío de la linealidad se encontró que F experimental fue menor al F tabulado, lo que nos permite afirmar que no existe un desvío significativo de la linealidad ya que estadísticamente no hay dispersión de los resultados entre réplicas para las distintas concentraciones.

Todo lo anterior para resumir que los errores sistemáticos no afectan la linealidad ni del sistema ni de los métodos evaluados y que ésta es descrita por el modelo lineal propuesto.

d. Precisión y Exactitud

Para determinar la precisión y la exactitud de la medida en cada método de estudio se realizaron tres medidas por cada día y de cada nivel de concentración de los tres utilizados, obteniéndose los datos presentados en la Tabla 4-30 y su posterior conversión a unidades de concentración expresados en la Tabla 4-31.

Tabla 4-30: Precisión y exactitud evaluada en cada uno de los métodos.

	Corazón (área mAU)		Bazo (área mAU)		Pulmones (área mAU)		Riñones (área mAU)		Hígado (área mAU)		Extremidad (área mAU)		Plasma (área mAU)	
	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm
0.4 µg/mL														
dia a	79.5	23.1	35.3	11.5	29.0	11.5	66.3	16.2	24.0	15.4	54.5	19.2	56.3	29.1
	78.0	23.4	36.0	11.6	29.4	11.5	66.5	16.0	24.1	15.1	54.4	19.1	56.4	28.9
	79.1	23.2	36.2	11.4	29.3	11.6	66.4	16.1	23.6	14.9	54.0	19.0	56.5	28.7
dia b	78.8	23.2	36.9	11.4	29.2	11.4	66.1	16.0	24.4	14.9	54.2	19.6	56.0	28.2
	78.1	23.3	35.6	11.6	29.7	11.5	65.7	16.2	23.9	15.6	54.9	19.2	55.9	28.8
	78.4	23.2	36.0	11.3	29.3	11.7	65.6	16.0	24.1	15.3	54.4	19.4	56.2	28.4
dia c	79.3	23.1	35.9	11.5	29.4	11.5	65.8	16.1	22.8	15.5	54.6	19.4	56.0	28.2
	78.6	23.3	35.5	11.4	29.5	11.4	66.4	16.2	23.1	15.2	55.1	19.3	56.1	28.8
	78.4	23.4	36.1	11.8	29.6	11.3	66.3	16.0	23.0	15.0	55.0	19.0	56.4	28.5
3.2 µg/mL														
dia a	464.5	160.0	490.2	172.8	419.3	152.9	390.2	154.7	393.5	147.5	447.0	165.2	740.1	224.3
	458.1	160.8	490.8	174.5	418.2	152.5	388.5	154.5	387.4	146.7	454.6	166.1	737.4	225.1
	459.3	160.9	486.8	177.2	419.5	152.6	389.0	153.5	389.5	145.2	447.2	165.0	738.8	225.3
dia b	468.0	160.9	490.1	180.4	420.3	152.4	388.9	152.9	387.5	141.9	441.1	164.7	737.3	225.8
	462.4	160.4	484.7	181.2	418.2	153.3	389.2	154.1	382.6	143.9	456.1	166.1	736.6	226.1
	465.2	160.7	492.0	176.0	418.4	154.1	390.3	153.5	383.4	141.2	451.2	163.9	735.8	225.4
dia c	462.0	160.6	489.5	174.3	416.9	152.8	389.3	153.1	379.8	140.3	454.3	164.0	735.0	222.4
	464.7	160.0	491.5	179.2	417.5	152.5	388.7	154.0	378.2	143.6	448.8	164.5	738.4	224.6
	463.4	161.0	488.3	177.8	418.1	153.1	390.0	153.6	381.3	141.9	443.3	161.9	734.5	224.8
6.4 µg/mL														
dia a	890.0	318.9	909.6	325.3	863.6	316.5	712.8	310.6	779.7	280.0	840.2	315.3	1501.5	442.4
	893.2	320.5	896.2	325.9	855.4	315.8	713.0	312.1	775.5	284.0	845.6	316.0	1499.2	450.7
	892.1	320.1	894.1	330.9	860.3	316.3	714.0	311.6	779.6	281.3	842.9	317.9	1498.2	445.2
dia b	886.7	319.2	904.2	329.0	855.1	316.0	710.7	312.6	765.9	286.9	844.6	316.2	1499.0	444.4
	896.5	319.7	908.0	329.8	859.2	316.6	712.2	310.7	769.2	289.9	855.7	312.4	1502.0	454.3
	889.2	320.0	888.2	325.7	852.4	318.4	715.8	312.1	766.0	283.5	850.9	317.7	1507.9	444.0
dia c	885.7	319.3	884.1	330.2	852.6	317.4	713.4	310.6	767.4	286.6	846.0	318.3	1503.5	445.5
	880.0	320.4	883.3	328.0	852.0	319.3	712.4	312.0	760.9	281.9	839.5	317.8	1497.6	443.3
	883.0	319.6	889.7	325.2	853.3	320.8	714.3	311.3	764.4	287.1	845.7	316.6	1500.6	444.8

Datos de área (mAU) obtenidos de la lectura de muestras preparadas en Concentraciones baja: 0.4 µg/mL, media: 3.2 µg/mL y alta 6.4 µg/mL, y medidas tres días diferentes a, b y c.

Tabla 4-31: Exactitud para cada uno de los métodos evaluados en términos de concentración.

Corazón ($\mu\text{g/mL}$)		Bazo ($\mu\text{g/mL}$)		Pulmones ($\mu\text{g/mL}$)		Riñones ($\mu\text{g/mL}$)		Hígado ($\mu\text{g/mL}$)		Extremidad ($\mu\text{g/mL}$)		Plasma ($\mu\text{g/mL}$)		
	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm
0.4 $\mu\text{g/mL}$														
día a	0.42	0.40	0.42	0.43	0.41	0.41	0.40	0.40	0.42	0.41	0.41	0.41	0.40	0.42
	0.40	0.41	0.43	0.43	0.41	0.41	0.40	0.40	0.43	0.41	0.41	0.41	0.40	0.41
	0.41	0.40	0.43	0.42	0.41	0.41	0.40	0.40	0.42	0.40	0.40	0.41	0.40	0.41
día b	0.41	0.40	0.43	0.42	0.41	0.41	0.40	0.40	0.43	0.40	0.40	0.42	0.40	0.40
	0.40	0.40	0.42	0.43	0.41	0.41	0.40	0.40	0.42	0.42	0.41	0.41	0.40	0.41
	0.41	0.40	0.43	0.42	0.41	0.42	0.40	0.40	0.43	0.41	0.41	0.41	0.40	0.41
día c	0.41	0.40	0.43	0.43	0.41	0.41	0.40	0.40	0.41	0.42	0.41	0.41	0.40	0.40
	0.41	0.40	0.42	0.42	0.41	0.41	0.40	0.40	0.42	0.41	0.41	0.41	0.40	0.41
	0.41	0.41	0.43	0.43	0.41	0.41	0.40	0.40	0.42	0.40	0.41	0.41	0.40	0.41
3.2 $\mu\text{g/mL}$														
día a	3.34	3.16	3.49	3.28	3.25	3.14	3.22	3.20	3.55	3.44	3.31	3.33	3.26	3.24
	3.29	3.17	3.50	3.31	3.25	3.13	3.21	3.20	3.50	3.42	3.37	3.34	3.25	3.25
	3.30	3.18	3.47	3.36	3.25	3.13	3.21	3.18	3.51	3.39	3.31	3.32	3.25	3.25
día b	3.36	3.18	3.49	3.42	3.26	3.13	3.21	3.17	3.50	3.31	3.27	3.32	3.25	3.26
	3.32	3.17	3.45	3.43	3.25	3.14	3.21	3.19	3.46	3.36	3.38	3.34	3.24	3.26
	3.34	3.17	3.50	3.34	3.25	3.16	3.22	3.18	3.46	3.29	3.34	3.30	3.24	3.25
día c	3.32	3.17	3.49	3.31	3.24	3.13	3.21	3.17	3.43	3.27	3.36	3.30	3.24	3.21
	3.34	3.16	3.50	3.40	3.24	3.13	3.21	3.19	3.42	3.35	3.32	3.31	3.25	3.24
	3.33	3.18	3.48	3.37	3.24	3.14	3.22	3.18	3.44	3.31	3.28	3.26	3.23	3.24
6.4 $\mu\text{g/mL}$														
día a	6.57	6.36	6.32	5.99	6.49	6.29	6.38	6.36	6.81	6.47	6.22	6.32	6.43	6.39

	6.59	6.39	6.23	6.00	6.43	6.27	6.38	6.39	6.78	6.56	6.26	6.34	6.42	6.51
	6.58	6.38	6.22	6.09	6.47	6.28	6.39	6.38	6.81	6.50	6.24	6.38	6.42	6.43
día b	6.54	6.36	6.29	6.05	6.43	6.28	6.36	6.40	6.70	6.63	6.25	6.34	6.42	6.42
	6.62	6.37	6.31	6.07	6.46	6.29	6.37	6.36	6.72	6.70	6.33	6.27	6.44	6.56
	6.56	6.38	6.18	5.99	6.41	6.32	6.40	6.39	6.70	6.55	6.30	6.37	6.46	6.41
día c	6.53	6.37	6.15	6.07	6.41	6.30	6.38	6.36	6.71	6.62	6.26	6.38	6.44	6.43
	6.49	6.39	6.14	6.03	6.41	6.34	6.37	6.39	6.65	6.51	6.21	6.37	6.42	6.40
	6.51	6.37	6.19	5.98	6.42	6.37	6.39	6.37	6.68	6.63	6.26	6.35	6.43	6.42

Concentración calculada de muestras preparadas en concentraciones baja: 0.4 µg/mL, media: 3.2 µg/mL y alta 6.4 µg/mL, y medidas tres días diferentes a, b y c.

Para determinar la precisión y exactitud de los métodos se empleó la ecuación generada en la curva de calibración para cada caso y se calcularon las concentraciones correspondientes mostradas en la Tabla 4-31, posteriormente se calculó el coeficiente de variación y el error relativo para cada caso correspondiente, diferenciándose en ambos caso la variación intradía e interdía como se muestra en la Tabla 4-32.

Tabla 4-32: Determinación de precisión (CV,%) y exactitud (ER,%) para cada uno de los métodos evaluados.

Parámetro		Corazón		Bazo		Pulmones		Riñones		Hígado		Extremidad		Plasma	
		275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm								
CV% interdía	Baja Conc	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.5	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.9 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2
	Media Conc.	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.4	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2
	Alta Conc	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.5
CV% intradía	Día a	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.4	1.1 ± 0.5	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.4
	Día b	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.5	1.2 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.5	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.4	1.5 ± 0.7	1.0 ± 0.6	0.9 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.6
	Día c	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.5	1.3 ± 0.1	0.2 ± 0.3	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.4	1.3 ± 0.7	0.7 ± 0.6	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.6

		0.2	0.2	0.3	0.5	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.3	0.4	0.4	0.1	0.4
ER% interdía	Baja Conc	2.2 ± 0.4	0.8 ± 0.1	6.5 ± 0.3	6.5 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.9 ± 0.4	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	5.5 ± 1.3	2.5 ± 0.4	1.7 ± 0.6	2.9 ± 0.8	0.9 ± 0.2	2.3 ± 0.9
	Media Conc.	3.9 ± 0.5	0.9 ± 0.0	8.9 ± 0.1	5.0 ± 1.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.7	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.2	8.6 ± 1.4	4.6 ± 1.8	3.9 ± 0.1	3.6 ± 0.6	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.4
	Alta Conc	2.4 ± 0.6	0.4 ± 0.0	2.7 ± 0.9	5.8 ± 0.1	0.6 ± 0.4	1.5 ± 0.5	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	5.1 ± 1.0	2.7 ± 0.9	2.2 ± 0.5	0.8 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.3
ER% intradía	Día a	2.9 ± 0.4	0.7 ± 0.3	5.8 ± 3.4	5.4 ± 1.4	1.5 ± 0.4	1.9 ± 1.2	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.2	7.4 ± 2.2	3.5 ± 2.8	2.6 ± 1.4	2.4 ± 1.6	1.0 ± 0.6	1.8 ± 1.4
	Día b	3.0 ± 1.4	0.7 ± 0.2	6.0 ± 3.4	6.0 ± 0.3	1.4 ± 0.8	2.2 ± 0.8	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2	6.6 ± 1.9	3.3 ± 0.5	2.4 ± 1.3	2.9 ± 1.5	0.9 ± 0.4	1.5 ± 0.5
	Día c	2.7 ± 1.2	0.8 ± 0.3	6.4 ± 2.6	5.9 ± 0.9	1.3 ± 1.1	1.8 ± 0.8	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	5.2 ± 1.8	3.0 ± 0.4	2.9 ± 0.8	2.1 ± 1.4	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.8

Resultados obtenidos de la evaluación de: precisión expresada como el promedio del coeficiente de variación (CV) ± la desviación estándar del calculado para cada muestra, y exactitud expresada como el promedio del error relativo (ER) ± desviación estándar del calculado para cada muestra. Ambos parámetros fueron medidos a nivel intradía (muestras preparadas el mismo día a 3 niveles de concentración) y a nivel interdía (muestras preparadas en 3 diferentes días a un mismo nivel de concentración).

Con parámetros como precisión y exactitud se evalúa el desempeño del método frente a resultados reales, para tener certeza que bajo las condiciones utilizadas se obtienen resultados confiables y veraces.

Estos parámetros fueron evaluados usando tres niveles de concentración (0.4, 3.2 y 6.4 µg/mL) en tres días diferentes. De acuerdo a los resultados obtenidos y mostrados previamente, para precisión y exactitud el CV% fue inferior al 3% y el ER% inferior al 9% en todos los casos. Es así como los valores encontrados fueron apropiados para la validación del método en las matrices biológicas de acuerdo a lo sugerido por las guías de ICH (ICH 2005) donde se acepta para la precisión un CV% < 15% y para la exactitud un ER% entre el 15% del valor nominal. Aunque se haya obtenido un alto valor del ER % en bazo e hígado comparados con las otras matrices debido a su complejidad, este hecho es atribuido al rol que ocupan estos órganos en el metabolismo de xenobióticos, y se encuentra dentro de los límites permitidos por lo tanto fue posible concluir que cada uno de los métodos evaluados se consideran precisos desde el punto de vista de la reproducibilidad y exactos en las condiciones usadas.

e. Estabilidad de las muestras

Fue evaluada en ciclos de enfriamiento – temperatura ambiente y una evaluación adicional teniendo en cuenta la permanencia en el automuestreador.

- Enfriamiento – temperatura ambiente

Los datos se presentan como el porcentaje de variación de las muestras respecto a la lectura de las muestras recién preparadas tomadas como el 100% (Tabla 4-33).

Tabla 4-33: Evaluación de la estabilidad de las muestras posterior a tres ciclos de enfriamiento – temperatura ambiente.

	Corazón (µg/mL)		Bazo (µg/mL)		Pulmones (µg/mL)		Riñones (µg/mL)		Hígado (µg/mL)		Extremidad (µg/mL)		Plasma (µg/mL)	
	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm
0.4 µg/mL														
a	1.15	1.06	0.16	0.82	1.70	1.80	0.44	1.04	0.99	1.16	0.35	0.51	0.91	0.67
b	1.54	1.18	0.49	0.41	1.53	0.46	0.22	0.52	0.13	0.58	0.18	0.98	0.40	0.34
c	1.34	1.86	0.33	1.60	0.34	1.78	0.22	0.52	2.06	1.14	0.69	0.99	0.31	0.69
Prome-dio	1.34	1.37	0.33	0.94	1.19	1.35	0.29	0.69	1.06	0.96	0.41	0.83	0.54	0.57
desv. Estándar	0.20	0.43	0.16	0.61	0.74	0.77	0.13	0.30	0.96	0.33	0.26	0.27	0.32	0.20
12.8 µg/mL														
a	0.55	1.02	0.60	1.40	0.51	0.53	1.07	0.86	1.01	1.36	0.69	0.44	1.08	1.29
b	0.15	1.32	1.08	1.72	0.27	0.14	0.81	0.36	1.42	1.10	1.20	0.38	1.08	1.64
c	0.37	1.97	0.84	1.19	0.16	0.27	0.80	0.62	1.31	2.05	0.58	0.91	1.65	1.67
Prome-dio	0.36	1.43	0.84	1.44	0.31	0.31	0.89	0.61	1.25	1.50	0.82	0.57	1.27	1.54
desv. Estándar	0.20	0.49	0.24	0.27	0.18	0.20	0.15	0.25	0.21	0.49	0.33	0.29	0.33	0.21

Los valores están expresados como el porcentaje de variación respecto a un 100% tomado de la medida inicial de las muestras (recién preparadas); a, b, y c son réplicas de cada concentración.

- Evaluación en condiciones del automuestreador: 45 h a 23°C.

Los datos se presentan como el porcentaje de variación de las muestras respecto a la lectura de las muestras recién preparadas tomadas como el 100% (Tabla 4.34).

Tabla 4-34: Evaluación de la estabilidad de las muestras posterior a someterlas a las condiciones más parecidas a las reales estando en el automuestreador.

	Corazón (µg/mL)		Bazo (µg/mL)		Pulmones (µg/mL)		Riñones (µg/mL)		Hígado (µg/mL)		Extremidad (µg/mL)		Plasma (µg/mL)	
	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm	275 nm	321 nm
0.4 µg/mL														
a	3.18	6.00	3.50	2.04	1.70	3.46	2.20	3.11	0.99	3.08	4.86	4.60	1.92	4.03
b	3.54	1.80	3.20	1.51	4.60	2.13	1.33	2.40	0.13	3.86	3.34	1.47	2.39	3.87
c	3.39	1.86	3.33	3.34	3.44	5.34	1.69	4.19	2.06	2.48	4.16	2.15	1.66	2.76
Prome- dio	3.37	3.22	3.35	2.30	3.25	3.64	1.74	3.23	1.06	3.14	4.12	2.74	1.99	3.55
desv. Estándar	0.18	2.41	0.15	0.94	1.46	1.61	0.44	0.90	0.96	0.69	0.76	1.65	0.37	0.69
12.8 µg/mL														
a	3.50	2.05	3.59	2.85	3.01	3.53	1.77	1.62	2.30	3.14	1.90	1.12	2.36	2.40
b	3.03	1.32	2.15	3.17	2.29	3.14	1.52	1.25	2.71	2.78	2.40	1.07	2.05	2.31
c	2.13	3.69	4.47	2.65	2.07	3.25	1.50	2.25	3.26	2.05	1.79	1.33	2.63	2,91
Prome- dio	2.89	2.35	3.40	2.89	2.46	3.31	1.60	1.71	2.76	2.66	2.03	1.17	2.35	2.54
desv. Estándar	0.70	1.21	1.17	0.26	0.49	0.20	0.15	0.51	0.48	0.56	0.33	0.14	0.29	0.32

Los valores están expresados como el porcentaje de variación respecto a un 100% tomado de la medida inicial de las muestras (recién preparadas); a, b, y c son réplicas de cada concentración.

Evaluar la estabilidad de muestras de origen biológico por la complejidad de su composición es realmente importante para garantizar que no se altera la respuesta por condiciones ambientales circunstanciales. De acuerdo a los datos obtenidos se puede apreciar que ocurrió una ligera variación tras los ciclos de enfriamiento – temperatura ambiente inferior al 2% en todos los casos considerándose adecuada de acuerdo a la

variación que es aceptada en los ensayos inter día. Con estos resultados es posible inferir que las muestras pueden ser almacenadas antes de ser analizadas por CLAE aunque se recomienda mantener las muestras en condiciones de refrigeración (4°C) siempre y solo sacar la muestra que se va a analizar con el fin de evitar posibles degradaciones de los componentes endógenos de las matrices.

Por otro lado, la evaluación a condiciones del automuestreador generó una baja variación en la respuesta instrumental, aunque mayor a la anterior atribuyéndose a una posible evaporación ligera de las muestras por lo que aumentó levemente el área obtenida en todos los casos, recomendando dejar menos de 80 muestras en el automuestreador para obtener mínimas desviaciones. De todos modos, la variación es aceptable y se infiere que bajo las condiciones de trabajo es posible obtener resultados veraces y dentro de los límites de desviación permitidos.

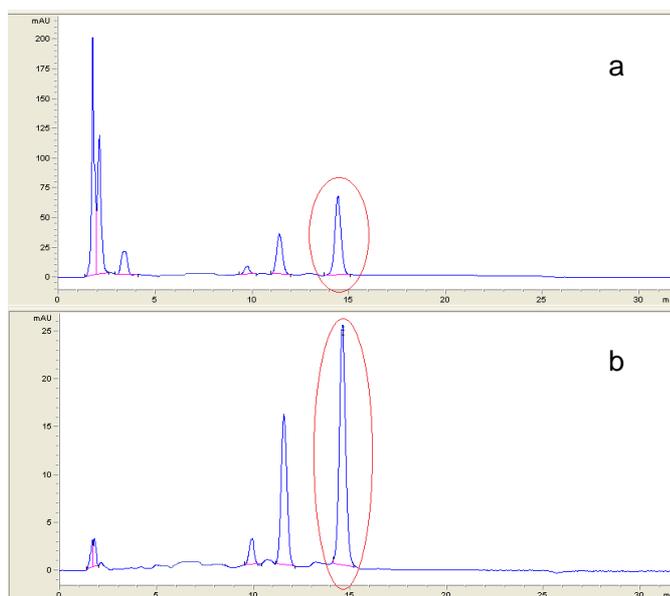
4.4 Evaluación de la biodistribución de 6MC

Para el desarrollo del estudio de biodistribución, se hizo una revisión de la literatura relacionada como se indica a continuación, con el fin de definir los tiempos de muestreo y los principales órganos a tener en cuenta. De ese modo, los tiempos de muestreo descritos previamente en la metodología fueron ajustados basados en trabajos reportados en la literatura como por ejemplo el estudio de biodistribución de verde de indocianina en ratones sanos, entregado de forma libre y desde nanopartículas, en donde los tiempos de muestreo tras administración intravenosa (IV) para la forma libre fueron 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos y para la forma nanoparticulada fueron 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos. Los órganos seleccionados para el estudio fueron plasma, hígado, riñones, pulmones, corazón y bazo (Saxena *et al.*, 2005). También se consideró el estudio de biodistribución de nanopartículas preparadas con mezcla de polímeros ácido (poli láctico - co - glicólico) (PLGA) con polietilenoglicol (PEG) y radiomarcadas con I-colesterilalanina en ratones; tras administración intravenosa se realizó un sólo muestreo a las 3 horas. Los órganos analizados fueron hígado, bazo, pulmones, músculo, hueso (femur), intestinos riñones, vejiga urinaria, cerebro y tiroides (Beletsi, 2005). Otro estudio de biodistribución fue realizado para dextrano fluorescente en ratones, entregado a través de nanopartículas administrado por vía intravenosa; los tiempos de muestreo fueron 0, 30, 60, 120, 240 y 480 minutos y se evaluaron en hígado, bazo, pulmón, riñón y

corazón (Upasna, 2000). Recientemente se estudió la biodistribución del metabolito activo del antineoplásico Irinotecan entregado desde nanopartículas de un polímero modificado y administrado vía intravenosa. Los muestreos se hicieron a 1 hora y a las 8 horas luego de la inyección. Como órganos de estudio se escogieron hígado, riñones, pulmones y bazo (Ebrahimnejad, 2011).

Con estos reportes, así como ensayos previos realizados, se decidió trabajar con los órganos: hígado, corazón, bazo, riñones, pulmones, plasma y extremidad. Esta última fue escogida debido a que la molécula a evaluar, como se mencionó previamente, mostró actividad en el modelo de inflamación “edema plantar inducido por carragenina” y se pretendió investigar si 6MC alcanzaba este sitio. A su vez, los tiempos de muestreo escogidos para la evaluación fueron 15, 30, 60 y 120 minutos para la evaluación de 6MC libre y 15, 30, 60, 120 y 240 minutos para 6MC microencapsulada (6MC– MP). Para la evaluación de la biodistribución se realizó una administración intraperitoneal de la 6MC libre y microencapsulada basados en estudios previos en donde se demostró la actividad antiinflamatoria de 6MC por esta vía (Vergel, 2010). En la Figura 4-7 se presenta un ejemplo de lo obtenido por CLAE de una muestra de plasma a los 15 minutos después de la administración de 6MC-libre.

Figura 4-7: Cromatograma de muestra de plasma en el estudio de biodistribución.

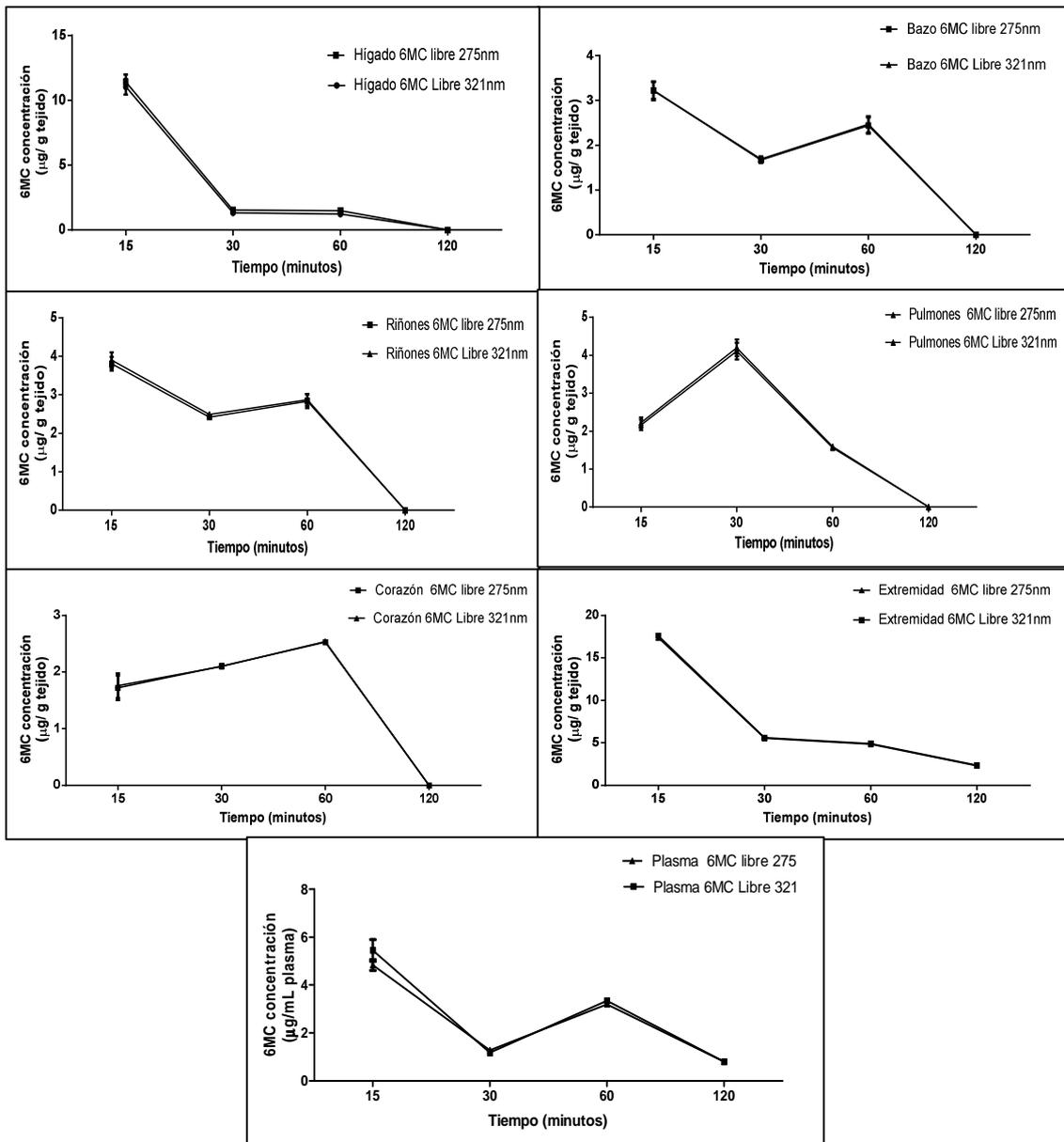


Encerrado en el círculo se encuentra el pico cromatográfico de 6MC, evaluación en plasma 15 minutos luego de la administración de la dosis vía i.p (200 mg/Kg). a. 275 nm; b. 321 nm.

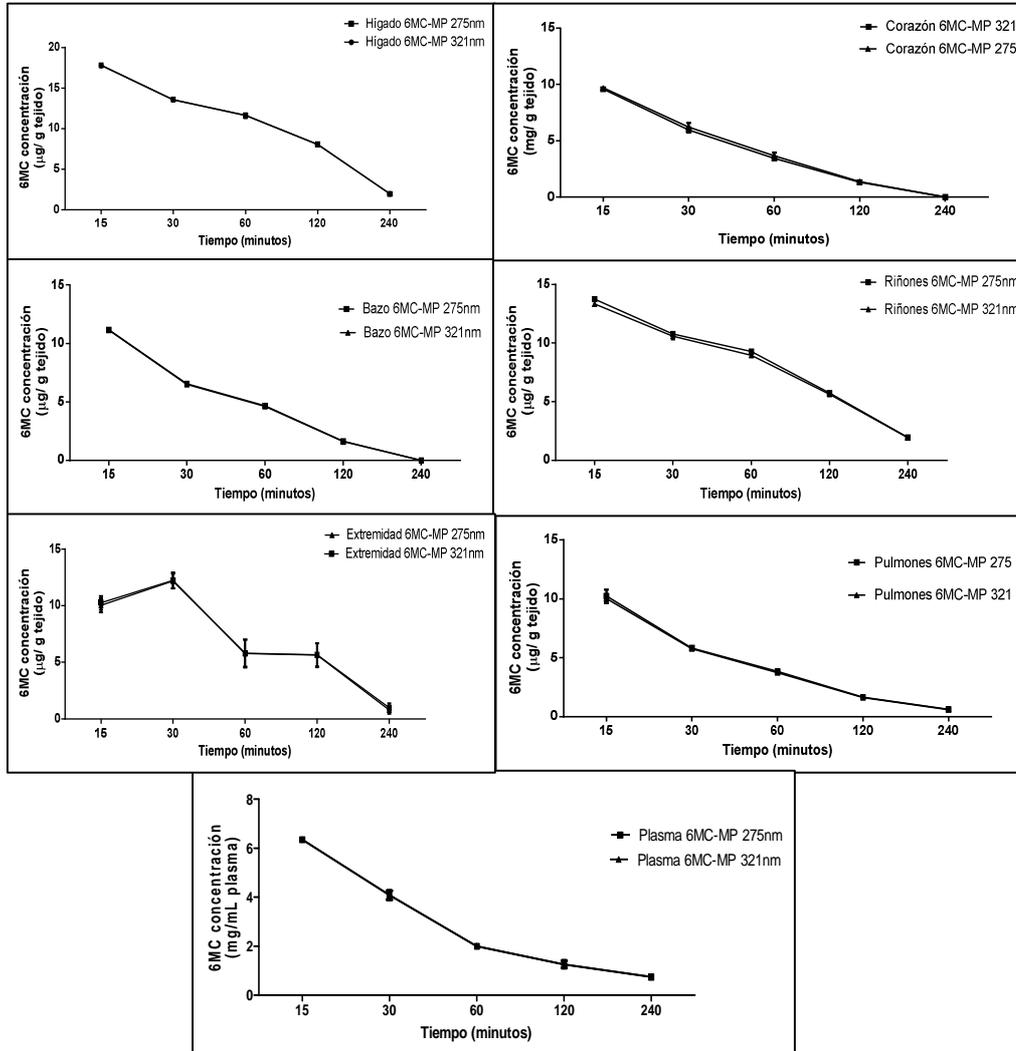
Posteriormente, para la presentación de los resultados obtenidos en la evaluación de la biodistribución, los datos fueron expresados como μg de 6MC / g de tejido entendiéndose éste último como cada una de las matrices biológicas estudiadas. Para plasma corresponde a μg de 6MC / mL de plasma manteniendo la misma escala.

Como primera medida, en estos resultados se decidió corroborar que la respuesta obtenida para biodistribución en las longitudes de onda de estudio presentaran la misma tendencia. Como se observa en los gráficos 4-10 y 4-11, el comportamiento es el mismo en las 2 longitudes de lectura tanto para la evaluación de la forma libre como para la microparticulada respectivamente, por lo que el análisis de los resultados de la biodistribución se puede realizar a cualquiera de las dos longitudes de onda.

Gráfico 4-10: Evaluación de la Biodistribución de 6MC– libre en ratas Wistar.



Respuesta obtenida para las 2 longitudes de onda utilizadas. Los datos se reportan como el promedio \pm la desviación estándar de tres determinaciones (n= 3 animales por grupo) después de administración i.p de 200 mg/Kg.

Gráfico 4-11: Evaluación de la Biodistribución de 6MC - MP en ratas Wistar.

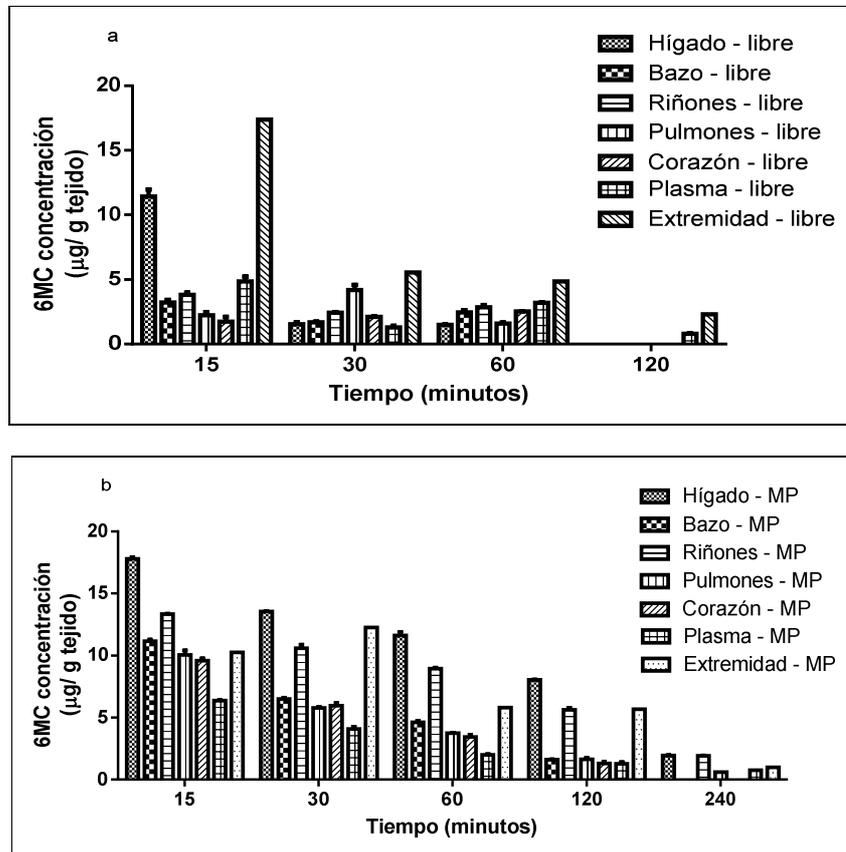
Respuesta obtenida para las 2 longitudes de onda utilizadas, Los datos se reportan como el promedio \pm la desviación estándar de tres determinaciones (n = 3 animales por grupo) después de administración i.p de 200 mg/Kg.

Por lo anterior, se escogieron los resultados obtenidos a 321 nm para presentar los resultados del estudio de biodistribución como se observa en el gráfico 4-13.

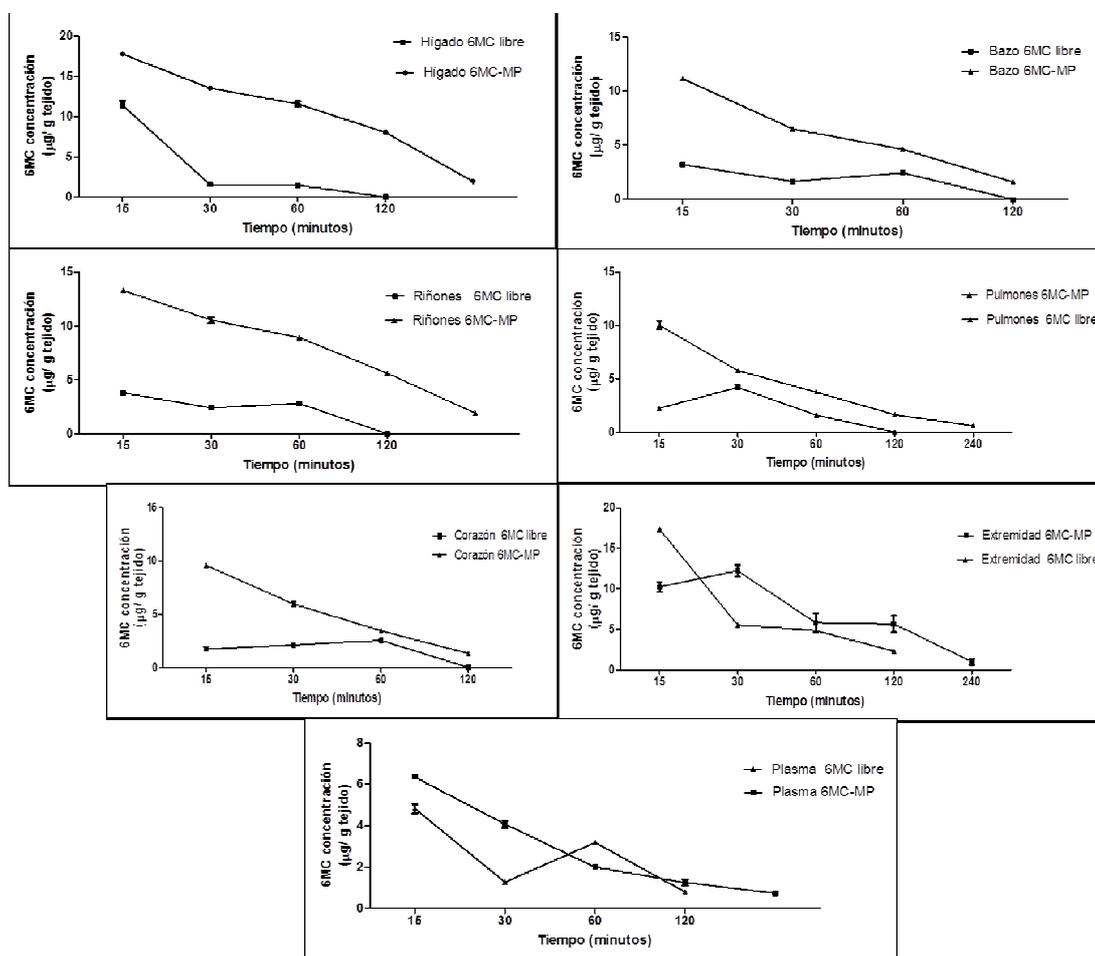
De acuerdo al gráfico 4-13 fue posible observar que en términos generales la biodistribución de 6MC fue extensa en todos los órganos evaluados, siendo predominante en aquellos órganos con elevada irrigación sanguínea como hígado,

corazón, pulmones, bazo y como consecuencia de la captación por parte del sistema fagocítico mononuclear (MPS por sus siglas en inglés). Estos resultados son concordantes con lo que se ha reportado en estudios similares de biodistribución como el reportado para verde de Indocianina (Saxena *et al.*, 2005) y el reportado para orientina (Li *et al.*, 2008) en los cuales, el compuesto de interés fue ampliamente distribuido en los tejidos con abundante suministro de sangre tales como hígado, riñón, pulmón y bazo lo que implica que su biodistribución depende del flujo sanguíneo o velocidad de perfusión en estos órganos que además hacen parte del MPS del organismo, sistema que es responsable de la eliminación de partículas extrañas de la circulación sanguínea.

Es importante resaltar la acumulación que presenta 6MC en la extremidad desde el inicio de la evaluación, justificado por la importante vascularización que tiene dicho órgano, al alcanzar la circulación sistémica, 6MC es llevada tanto al compartimento central como al periférico. Por otro lado, al ser una zona altamente lipofílica hace que las moléculas tengan una menor depuración desde este sitio, diferente a si estuviera en el compartimento central donde pueden generarse procesos como metabolismo más rápidamente. Es decir que si se hubieran evaluado otros sitios anatómicos periféricos habría sido muy probable encontrar también 6MC en elevada concentración.

Gráfico 4-12: Biodistribución de 6MC libre y 6MC - MP en ratas Wistar.

a. 6MC – libre; b. 6MC- MP, en las diferentes matrices de estudio luego de la administración i.p de 200 mg/Kg de peso en ratas Wistar (n=3 por grupo). Resultados expresados en µg de 6MC / g de tejido de los datos obtenidos a 321 nm. Los datos se reportan como el promedio \pm la desviación estándar de tres determinaciones.

Gráfico 4-13: Biodistribución de 6MC libre y 6MC - MP en cada órgano evaluado.

Los datos se reportan como el promedio \pm la desviación estándar de tres determinaciones (n= 3 animales por grupo).

En términos de concentración, 6MC-libre presentó un rango entre 1.7 y 17.7 $\mu\text{g/g}$ siendo las concentraciones más altas en extremidad e hígado y las más bajas en corazón y pulmón desde la evaluación en 15 minutos, mientras que para 6MC-MP en el mismo tiempo se encontraron concentraciones entre 6.35 y 17.7 $\mu\text{g/g}$ siendo las más altas en hígado y riñones y las más bajas en corazón y plasma. De acuerdo a esto, es posible inferir que a través de las micropartículas, 6MC se encuentra más rápido en la circulación sistémica y por ende puede distribuirse en los distintos órganos, es posible sugerir que este sistema de entrega favorece la biodisponibilidad de 6MC. Dicho rango de concentración es similar al encontrado en el estudio llevado a cabo con verde de

indocianina cuyas concentraciones para la forma libre varían entre 0.1 y 2.0 $\mu\text{g/g}$ y para la forma nanoparticulada entre 0.5 y 5.0 $\mu\text{g/g}$ (Saxena *et al.*, 2005) teniendo en cuenta que la dosis inicial fue inferior a la usada en el presente estudio (200 mg/Kg), entonces es posible inferir que la cantidad de 6MC encontrada en los diferentes órganos es comparable con estudios realizados para otros fármacos dentro de un rango bajo pero cuantificable.

Para 6MC – MP se evidenció una máxima concentración de 6MC en riñones desde los 15 minutos seguido de hígado y, teniendo en cuenta que en las demás matrices evaluadas la concentración disminuye rápidamente, es posible proponer al hígado como principal órgano responsable de la metabolización-eliminación de 6MC y los riñones como principal órgano de excreción. Esto soportado en la evidencia de que tales órganos son los involucrados en el metabolismo-eliminación y excreción que se ha reportado para cumarina (1,2 benzopirona) evaluado, en dosis de 200mg/Kg en ratas Fisher 344 tras la formación de un derivado 3,4 epóxido cumarínico, metabolito mayoritario que por reacomodación produce o-hidroxifenil acetaldehído el cual finaliza en ácido o-hidroxifenilacético y/o o-hidroxifeniletanol (Born *et al.*, 2003). Un comportamiento similar fue reportado posteriormente para cumarina tras una evaluación *in vitro* en células de citosol de ratas Fisher 344 (Vasallo *et al.*, 2004). La elevada acumulación en hígado en los primeros 15 minutos (máxima concentración encontrada) sugiere que ocurre una rápida remoción desde la circulación sanguínea hacia el hígado como ha sido reportado previamente para otros fármacos en sus estudios de biodistribución (Saxena *et al.*, 2005).

Respecto a los niveles plasmáticos de 6MC evaluados, se encontró que desde la concentración máxima alcanzada a los 15 minutos, 4.8 $\mu\text{g/mL}$ para 6MC-libre y 6.4 $\mu\text{g/mL}$ para 6MC-MP, ocurre una rápida remoción de éste hacia los demás órganos evaluados principalmente los de eliminación bien sea la 6MC libre como la microencapsulada. Sin embargo, es importante resaltar que con el sistema de entrega se evidencia una liberación controlada que mantiene concentraciones de fármaco en mayor cantidad y por más tiempo que al inicio, puede reflejarse en una mayor actividad farmacológica, mientras que para la forma libre se evidenció una mayor fluctuación de 6MC en el tiempo. Lo mencionado sugiere que con 6MC – MP se controlan los niveles de 6MC presentes en el organismo hecho que podría verse representado en disminución de posibles efectos secundarios y un posible direccionamiento hacia la actividad biológica

deseada como es el objetivo de las investigaciones actuales sobre sistemas de entrega de fármacos.

A los 120 minutos, para la forma 6MC – libre solo fue encontrada en plasma y en extremidad en una baja concentración; en contraste con el sistema 6MC – MP donde aún se encontró 6MC en todos los órganos evaluados e incluso se mantuvo cuantificable en casi todos los órganos (excepto corazón y bazo) a los 240 minutos después de su administración. De acuerdo a éstos resultados fue posible inferir que el sistema de entrega microparticulado libera controladamente el fármaco prolongando su permanencia en el organismo y posiblemente sosteniendo el efecto farmacológico por más tiempo.

Asimismo, a los 15 minutos luego de la administración como se observa en los gráficos 4-12 y 4- 13, para el sistema microparticulado se encontró una mayor concentración de 6MC comparado con la forma libre en todos los órganos, mientras que 6MC libre presenta mayor variabilidad en el tiempo como se observa más claramente en el gráfico 4-14.

Comparando cada una de las matrices respecto a la forma de entrega del fármaco, 6MP– libre y 6MP- MP, es posible evidenciar una mayor uniformidad de dosis dada a través de 6MC-MP (menor dispersión en las concentraciones encontradas en cada uno de los tres animales evaluados). Este hecho puede ser atribuido a que la suspensión de 6MC-MP administrada es más homogénea que la de 6MC-libre dado el estado físico del fármaco ya que mientras en 6MC-MP se están administrando micropartículas en las que se tiene una dispersión molecular de PCL y 6MC, en 6MC-libre se están administrando cristales irregulares de 6MC.

Como se observa en el gráfico 4-14, con las micropartículas se logra una mayor uniformidad en la dosis suministrada, que se refleja en una tendencia a la eliminación de manera controlada. Es de resaltar que con el sistema microparticulado se evidencia una mayor acumulación de 6MC en hígado y riñones respecto a la forma libre lo que se puede explicar por la cantidad de fármaco disponible en el organismo y que está listo para ser eliminado bien sea mediante metabolismo y/o excreción directa. El mismo comportamiento fue reportado para la biodistribución del verde de Indocianina, donde las concentraciones en riñones desde la forma nanoparticulada son aproximadamente el

doble de las encontradas de la forma libre de igual modo que en hígado pulmón corazón y bazo (Saxena, *et al.*, 2005).

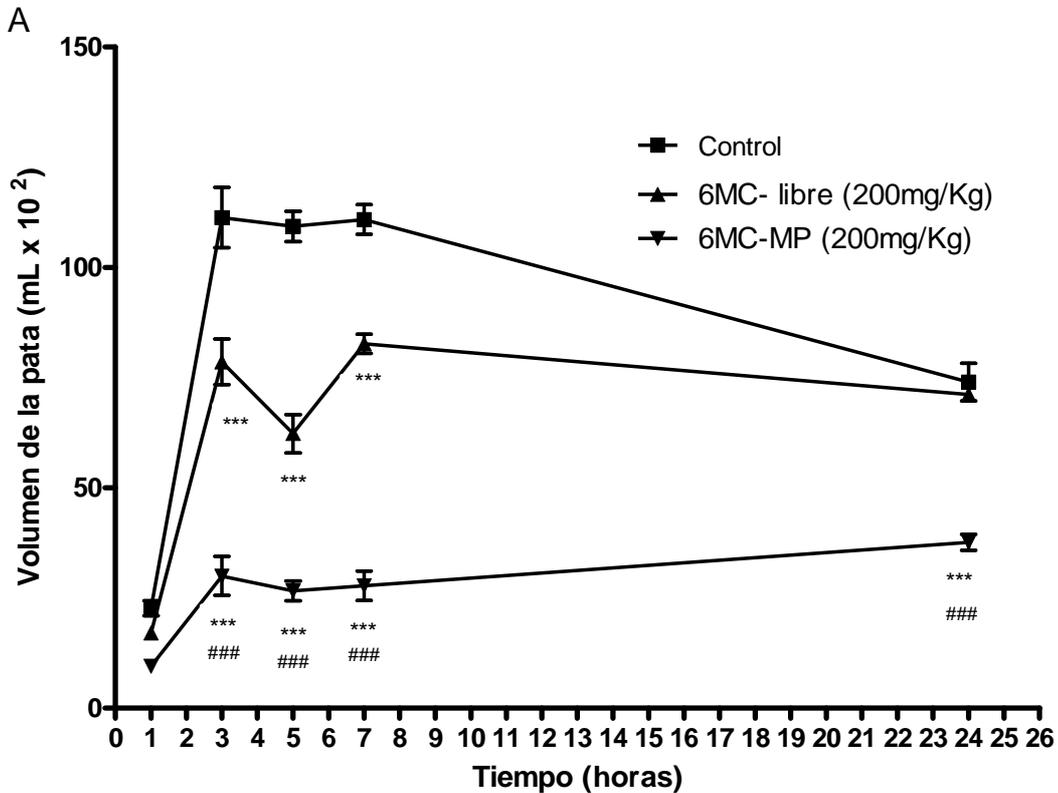
Es posible inferir que mediante el uso del sistema microparticulado se mejoró la entrega de 6MC, evidenciado por una acumulación casi tres veces mayor comparada con la entrega libre de éste, por lo que, sí se disminuye la dosis en 6MC - MP posiblemente sean alcanzados los mismos efectos farmacológicos deseados y encontrados por Vergel en la evaluación de la actividad antiinflamatoria (Vergel, 2010), es posible también que se disminuyan los efectos secundarios y/o no deseados de ésta.

4.5 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de 6MC – MP

El modelo usado para evaluar la actividad de 6MC fue el de edema plantar inducido por carragenina el cual se caracteriza por ser un modelo de inflamación aguda y que ha demostrado ser altamente predictivo para la actividad antiinflamatoria de un fármaco en la enfermedad inflamatoria humana (Winyard, 2003). Está dirigido a fármacos que actúen sobre la síntesis de prostaglandinas, antiinflamatorios no esteroideos e inhibidores de la COX (Winyard, 2003). Concretamente, carragenina causa una respuesta inflamatoria en tres fases. Una inicial mediada por la liberación de histamina y 5-hidroxitriptamina; una segunda fase mediada por la liberación de bradicinina y una fase final mediada por una producción local de prostaglandinas, especialmente de la serie E, la migración celular de polimorfos nucleares que comienza 2 horas después de la administración de carragenina (Olajide *et al.*, 1999; Winyard, 2003).

Para este modelo, el máximo de inflamación en el grupo control fue observado entre las 3 y 9 horas después de la administración subplantar de carragenina como se observa en el Gráfico 4-15, teniendo en cuenta que fueron resultados similares a los obtenidos en trabajos previos (Aragón *et al.*, 2010) para micropartículas del antiinflamatorio naproxeno. En el Gráfico 4-15 es posible observar que 6MC-libre presenta una importante actividad antiinflamatoria en términos de la disminución del volumen de la pata inflamada principalmente entre las horas 3 y 5 mientras que 6MC-MP presenta una actividad superior desde la primera hora manteniendo muy bajo el volumen de la pata y se mantiene hasta las 24 horas evaluadas en este modelo.

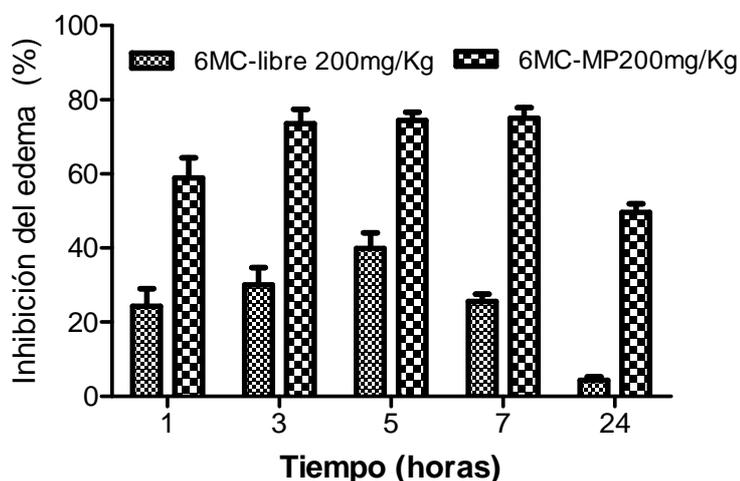
Gráfico 4-14: Evaluación de la actividad de 6MC libre y 6MC – MP en el curso temporal del edema plantar.



Resultados expresados como la media aritmética \pm desviación estándar (n = 6 animales por grupo), seguido de un Test de Bonferroni, *** p < 0.001 respecto al grupo control y ### p < 0.001 respecto al grupo 6MC - libre.

En términos de porcentaje de inhibición del edema se encontró que para 6MC – libre el máximo de actividad antiinflamatoria se ubicó entre las 3 y las 5 horas posterior a la administración de la carragenina, con porcentajes de inhibición del 30 y 40% respectivamente, como se observa en el Gráfico 4-16. Después de 7 horas de tratamiento dicho porcentaje cae hasta el 4% hacia las 24 horas, momento en donde ya no existe el efecto antiinflamatorio y no hay diferencia estadísticamente significativa con el grupo control.

Gráfico 4-15: Inhibición de la inflamación de 6MC libre y 6MC – MP en el modelo de edema plantar por carragenina.



Por otro lado, se observa que para 6MC – MP desde la primera hora se obtiene una significativa actividad antiinflamatoria mostrando un porcentaje de inhibición del 56% y posteriormente entre las 3 y 7 horas se evidenció un máximo porcentaje de inhibición por encima del 70% e incluso 24 horas después del tratamiento se observó un efecto antiinflamatorio con 46% de inhibición. Es notorio también que la actividad se mantiene sostenida en el tiempo sugiriendo una liberación controlada que depende de la degradación del polímero el cual en estudios previos se ha demostrado que exhibe una cinética de degradación no enzimática de orden cero (Woodruff y Hutmacher, 2010). Resultados similares han sido reportados para otros antiinflamatorios como diclofenaco del cual se desarrollaron sistemas microparticulados los cuales no sólo mejorarán su efecto antiinflamatorio sino que disminuirán considerablemente la actividad ulcerogénica que es causado por la forma libre (Barakat y Ahmad, 2008).

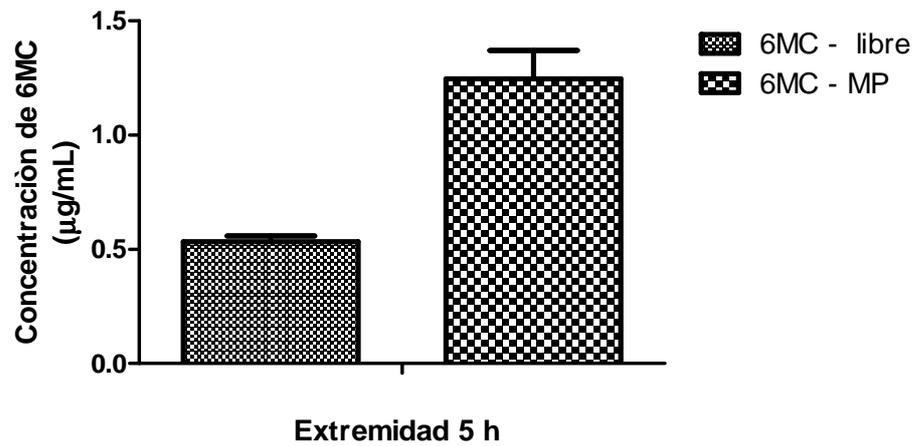
La actividad inicial (1h) es atribuida a una dosis de carga liberada desde las micropartículas a causa del denominado efecto “burst” (relacionado con el fármaco adsorbido en la superficie de las partículas). Esto se tradujo en un efecto, casi triplicado, de la inhibición de la inflamación comparándolo con 6MC-libre. Así mismo, es importante resaltar que los altos niveles de concentración de 6MC encontrados en extremidad en el estudio de biodistribución se relacionan significativamente con la actividad antiinflamatoria y posiblemente tenga relación con el mecanismo de acción en el sitio

donde se origina la inflamación. En este caso podría estar implicado en la fase final de la respuesta inflamatoria, en la inhibición de la producción local de prostaglandinas vía ciclooxigenasa y/o por la producción de leucotrienos como se evidenció en trabajos previos para otras cumarinas simples como umbelifenona (7-hidroxycumarina), esculetina, fraxetina, dafnetina entre otras, que *in vitro* demostraron inhibir la producción de lipoxigenasa, e *in vivo* inhibieron la formación del ácido 5- hidroxieicosatetraenoico (5-HETE), precursor de la síntesis de leucotrieno A₄ (Kontogiorgis y Hadjipavlov-Litina, 2005).

Respecto a la actividad antiinflamatoria de 6MC–MP casi del doble frente a 6MC- libre, puede estar relacionada con lo evaluado en la biodistribución, donde se evidenció significativas diferencias en la cantidad de ingrediente activo desde las dos formas evaluadas, explicado igualmente por la baja solubilidad de 6MC que dificulta la absorción del fármaco para alcanzar la circulación sistémica haciendo que la velocidad de absorción sea lenta a pesar de que la zona intraperitoneal tenga una alta irrigación sanguínea. Por el contrario, las micropartículas son un sistema de entrega de fármaco que involucra una dispersión molecular de 6MC en el polímero lo que no necesariamente mejora la solubilidad del fármaco pero sí mejora la velocidad de disolución (Barakat y Ahmad, 2008), de este modo mejora la velocidad de absorción y por ende promueve su actividad antiinflamatoria.

A las 5 horas del estudio se hizo un muestreo de los animales en tratamiento para evaluar la cantidad de 6MC presente en el organismo en términos de la biodistribución. Se escogió este tiempo teniendo en cuenta la máxima respuesta a la carragenina del grupo control y la máxima actividad antiinflamatoria del fármaco. A este tiempo sólo se encontró 6MC en la extremidad y aunque en una baja concentración, la de 6MC – MP fue casi tres veces superior a la de 6MC - libre como se muestra en el Gráfico 4-17, lo que se relaciona adecuadamente con lo encontrado respecto a la actividad antiinflamatoria.

Gráfico 4-16: Concentración de 6MC en la extremidad de ratas Wistar que cursan un proceso inflamatorio.



Los resultados se muestran como el promedio \pm la desviación estándar de tres determinaciones (n= tres animales por grupo). Datos obtenidos 5 h después de realizado el tratamiento.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se logró implementar una técnica analítica y validar las metodologías por CLAE para evaluar la biodistribución de 6-metilcumarina en plasma y otros tejidos de importancia, mediante detección UV a 275 y 321 nm en una columna C – 18 en fase reversa.

Se evaluó la biodistribución de 6 – metilcumarina en ratas Wistar como modelo animal cuando es administrada desde una forma libre y desde una forma microencapsulada, encontrando que se distribuye ampliamente en todos los órganos estudiados principalmente en los que presentan mayor irrigación.

Se evaluó el efecto de la microencapsulación de 6-metilcumarina tanto en la biodistribución como en la actividad antiinflamatoria, encontrando que las concentraciones obtenidas fueron superiores a la forma libre en todos los casos y reflejado en una mayor y sostenida actividad antiinflamatoria.

Se logró verificar el efecto antiinflamatorio de 6 - metilcumarina desde la forma libre y la forma microencapsulada y se demostró que a través del sistema de entrega microparticulas se mejora eficientemente la actividad de la misma en el modelo utilizado.

Se logró obtener información que contribuye a ampliar el perfil farmacológico de 6MC como molécula promisoría con actividad antiinflamatoria.

5.2 Recomendaciones

Evaluar de la biodistribución de 6-metilcumarina desde una administración oral con el fin de verificar el efecto de primer paso sobre esta.

Identificar de los metabolitos generados en el organismo para entender mejor el proceso de biotransformación luego de la administración de 6-metilcumarina.

Evaluar el perfil farmacocinético de 6-metilcumarina con el fin de obtener mayor información acerca de la molécula con promisoría actividad antiinflamatoria.

Estudiar otros posibles mecanismos de acción, relacionados con la ruta de ácido araquidónico, por el cual 6-metilcumarina ejerce su actividad antiinflamatoria.

Bibliografía

A.E.F.I (2001). Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Metodos Analíticos. Barcelona. 331p.

Akelah A. (1996). Novel utilizations of conventional formulations agrochemicals by controlled release. *Materials Science and Engineering*.4: 83-98

Alfonso M. (2008). Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela. Tesis de Doctorado, Facultad de Veterinaria. Págs. 42, 48-50.

Anand P., Singh B., Singh N. (2012). A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease.*Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20: 1175–1180.

Arango G. (2010) Compuestos derivados del ácido shikímico. Tesis Doctoral. Universidad de Antioquia, Fac. Química Farmacéutica. Págs. 34, 39.

Aragón D.M., Vergel N., Ospina L., Martinez F., Rosas J. (2010). Efecto de Naproxeno microencapsulado en microesferas de ácido Poli (Láctico - co-glicólico) sobre edema plantar inducido por carragenina en ratas. *Vitae*. 17: 59-65.

Barakat N. S., Ahmad A. A. (2008). Diclofenac sodium loaded-cellulose acetate butyrate: Effect of processing variables on microparticles properties, drug release kinetics and ulcerogenic activity. *Journal of Microencapsulation*. 25: 31-45.

Barrera J. (2012). Aporte al diseño de micropartículas de un polímero de policaprolactona cargadas con 6- metilcumarina. Trabajo de grado. Carrera de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia..

Beillerot A., Rodríguez J., Kirsch G. and Bagrel D. (2008). Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 18: 1102–1105.

Beletsi A., Panagi Z., Avgoustakis K. (2005). Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 298: 233-241.

Belij S., Miljkovic D., Popov A., Subota B., Timotijevic G., Slavic M., Mirkov I., Kataranovski D., Kataranovski M. (2012). Effects of subacute oral warfarin administration on peripheral blood granulocytes in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 1499-1507.

Bissonnette E., Tremblay G., Turmel V., Pirotte B., Reboud M. (2009). Coumarinic derivatives show anti-inflammatory effects on alveolar macrophages, but their anti-elastase activity is essential to reduce lung inflammation in vivo. *International Immunopharmacology*. 9: 49-54.

Bogan P., Kennedy R. (1996). Simultaneous determination of coumarin, 7-hydroxycoumarin and 7-hydroxycoumarin glucuronide in human serum and plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 686: 267-273.

Born S.L., Api A.M., Ford R.A., Lefever F.R., Hawkins D.R. (2003). Comparative metabolism and kinetics of coumarin in mice and rats. *Food and Chemical Toxicology*. 41: 247 - 258.

Dash T.K., Konkimalla V.B. (2012). Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*. 158: 15-33.

Dewick, P. (2002). *Medicinal Natural Products –A Biosynthetic Approach-*, 2^a ed. Ed. John Wiley & Sons Ltda. England. p 645-648.

Ebrahimnejad P., Dinarvand R., Jafari M., Tabasi S., Atyabi F. (2011). Characterization, blood profile and biodistribution properties of surface modified PLGA nanoparticles of SN-38. *International Journal of Pharmaceutics*. 406 : 122-127.

Eugene D. Olsen. (1990). *Métodos ópticos de análisis*. Editorial Reverté, España 1990. págs. 61-71,87.

FDA U.S. (2001). Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation, May 2001.

FELASA (1996). Federación de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorios europeos. Recomendaciones para los controles de sanidad en las unidades experimentales de ratones, ratas, hámsters, gerbos, cobayas y conejos. Original: *Lab Animals*. (1996) Vol. 30, p.193- 208.

Fresta M., Cavallarot G., Giammonat G, Wehrlis E. and Puglisi G. (1996). Preparation and characterization of polyurethane-Z-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. *Biomaterials*.17: 751-756.

Galbis J.A. (2000). Panorama actual de la Química Farmacéutica. Secretaria de publicaciones Universidad de Sevilla. Pág. 189. España.

Galvez V., Tanarro C. (2010). Toxicología de las nanopartículas. Centro Nacional de Nuevas Tecnologías. Seguridad y salud en el trabajo. Vol. 56. España. p 1-6.

Ghate M., Manohar D., Kulkarni R., Shobha R., Kattimani. (2003). Synthesis of vanillin ethers from 4-(bromomethyl) coumarins as anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*.38: 297- 302.

Hoult S., Payá J. R. (1996) Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology*. 27 (4) : 713–722.

ICH (International Conference on Harmonization). (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1). London. 17p

Irache, J. M. Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas. *Anales Sis San Navarra* [online]. 2008, vol.31, n.1 ISSN 1137-6627.

Kang K., Kong C., Seo Y, Kim M., Kim S. (2009). Anti-inflammatory effect of coumarins isolated from *Corydalis heterocarpa* in HT-29 human colon carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 2129–2134.

Kim S.C., Yu J., Lee J.W., Park E.S., Chi S.C. (2005). Sensitive HPLC method for quantitation of paclitaxel (Genexol®) in biological samples with application to preclinical pharmacokinetics and biodistribution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39:170–176.

Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina, D. (2005). Synthesis and Antiinflammatory activity of coumarin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48: 6400–6408.

Kostova I. (2005). Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*. 5: 29-46.

Koziara J., Lockman P., Allen D., Mumper R. (2003). In situ blood brain barrier transport of nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 20:1772-1778.

Li D., Wang Q., Yuan Z., Zhang L., Xu L., Cui Y., Duan K. (2008). Pharmacokinetics and tissue distribution study of orientin in rat by liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47: 429–434.

Li Z., Hu J., Sun M., Ji H., Zhao M., Wu D., Li G., Liu G., Chen N. (2011). Effect of compound IMMLG5521, a novel coumarin derivative, on carrageenan-induced pleurisy in rats. *European Journal of Pharmacology*. 661:118–123.

Lin S., Hsu W., Lo J., Tsai H., Hsiue G. (2011). Novel geometry type of nanocarriers mitigated the phagocytosis for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 154:84–92.

Liu Q., Li R., Zhu Z., Qian X., Guan W., Yu L., Yang M., Jiang X., Liu B. (2012). Enhanced antitumor efficacy, biodistribution and penetration of docetaxel-loaded biodegradable nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 430: 350–358.

Luo X., Li L., Zhang S., Lu J., Zeng Y., Zhang H., Xiang M. (2011). Therapeutic effects of total coumarins from *Urtica dentata* Hand on collagen-induced arthritis in Balb/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 138: 523–529.

Mallol J. (2008). *Manual de Radiofarmacia*. Editorial Díaz de Santos. p. 67, 79. España.

Melagraki G., Afantitis A., Igglessi O., Detsi A., Koufaki M., Kontogiorgis C., Hadjipavlou D. (2009). Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44. 3020–3026.

Monsky W., Fukumura D., Gohongi T., Ancukiewicz M., Weich H., Torchilin V., Yuan F., Jain R. (1999). Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor. *Cancer Research*. 59: 4129 – 4135.

Muller R., Radtke M., Wissing S. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: S131- S155.

Oberdörster, G., Oberdörster, E. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives Vol.* 113, (7).

Olajide O., Makinde J., Awe S. (1999). Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. *Journal Ethnopharmacology*. 66: 113-117.

Panyama J., Labhasetwar V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55 : 329–347.

Quattrocchi O. A., De Andrizzi S. A., Laba R.F. (1992). Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Pág. 74, 270.

Ravichandran V., Shalini S., Sundram K., Harish R. (2010). Validation of analytical methods – strategies & importance. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2: 18-22.

RELE G-SCQ-01. (1994). Guía para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos químicos, 1994. Rev. 1, abril 1994.

Sáez V., Hernández E., Sanz L., Katime I. (2004). Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5: 87-101.

- Sánchez-Martínez M**, Costa Marins R., Quincoces G., Gamazo C., Caicedo C., Irache J. M., Peñuelas I. (2013). Radiomarcaje y estudios de biodistribución de nanopartículas poliméricas como adyuvantes para la vacunación oftálmica frente a la brucelosis. *Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.remn.2012.11.005>
- Sashidhara K.**, Kumar A., Chatterjee M., Rao K., Singh S., Verma A., Palit G. (2011). Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarin derivatives as antidepressant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21: 1937–1941.
- Saxena V.**, Sadoqi M., Shao J. (2005). Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green: Biodistribution in healthy mice. *International Journal of Pharmaceutics*. 308: 200–204.
- Semete B.**, Booyesen L., Lemmer Y., Kalombo L., Katata L., Verschoor J., Swai H., (2010). *In vivo* evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 6: 662-671.
- Shenoy D.**, Amiji M. (2005). Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*. 293: 261–270.
- Shigeaki A.**, Kiba T., Hosokawa K., Nitobe S., Hirota T., Kobayashi H., Akasaka T., Uo M., Kuboki Y., Sato S., Watari F. Rosca I. (2010). Photophysical characterization of coumarin-doped poly (lactic acid) microparticles and visualization of the biodistribution. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. 181: 181– 185.
- Sparidans R.**, Lusuf D., Schinkel A., Schellens J., Beijnen J. (2010). Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for pravastatin and two isomeric metabolites in mouse plasma and tissue homogenates. *Journal of Chromatography B*. 878: 2751–2759.
- Sinko P.**, Martin S. (2006). *Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore. p 585,625.

Symeonidis T., Fylaktakidou K., Hadjipavlou D., Litinas K. (2009). Synthesis and anti-inflammatory evaluation of novel angularly or linearly fused coumarins. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44: 5012–5017.

Thati B., Noble A., Rowan R., Creaven B. Walsh M., McCann M., Egan D., Kavanagh K. (2007). Mechanism of action of coumarin and silver(I)–coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*. 21: 801–808.

Tiyaboonchai W. (2003). Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal*, 11: 51-66.

Tosi G., Costantino L, Rivasi F, Ruozi B, Leo E, Vergoni A.V., Tacchi R., Bertolini A., Vandelli M.A., Forni F. (2007). Targeting the central nervous system: in vivo experiments with peptide- derivatized nanoparticles loaded with loperamide and rhodamine-123. *Journal of Control Release*;122: 1- 9.

Upasna G., Sanjeeb K., Tapas K., Prahlad C., Amarnath M., Ghosh P. (2000). Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *International Journal of Pharmaceutics*. 202: 1–10.

Vassallo J., Hicks S., Daston G., Lehman-McKeeman L. (2004). Metabolic detoxification determines species differences in coumarin – induced hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*. 80: 249–257.

Vasconcelos J., Teixeira M., Barbosa J., Agra M., Nunes X., Giulietti A., Dos-Santos R., Soares M. (2009). Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 609: 126–131.

Vergel N. (2010). Estudio de la actividad anticonvulsivante de metabolitos secundarios tipo cumarina. Tesis doctoral. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. pp 171-172.

Vergoni A., Tosi G., Tacchi R., Vandelli M., Bertolini A., Costantino L., (2009). Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: in vivo biodistribution. *Nanomedicine: NBM*; 5: 369-377.

Winyard P., Willoughby D. (2003). Inflammations protocols. *Methods in Molecular Biology*, vol. 225: Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp 109 – 121.

Woodruff M A, Hutmacher D W. (2010). The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 35: 1217-1256.

Xin H., Chen L., Gu J., Ren X., Wei Z., Luo J, Chen Y., Jiang X., Sha X., Fang X. (2010). Enhanced anti-glioblastoma efficacy by PTX-loaded PEGylated poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 402: 238–247.

Xiong Y., Wu F., Wang J., Li J., Kong L. (2012). Attenuation of airway hyperreactivity and T helper cell type 2 responses by coumarins from *Peucedanum praeruptorum* Dunn in a murine model of allergic airway inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 141 : 314–321.