



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

---

---

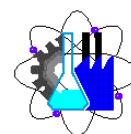
**Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC  
para cuantificación de Metil dodonato A**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**QUÍMICO INDUSTRIAL**  
**P R E S E N T A**  
**JOHANA ZINAY ALVARADO PÉREZ**

**DIRECTORA:**  
**DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**SEPTIEMBRE 2022**



El presente proyecto de tesis forma parte de los proyectos multidisciplinarios del Laboratorio 325. Química de Productos Naturales Básica y Aplicada del Centro de Investigaciones Químicas del Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Responsable: Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez).

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a **Dios**, quien como guía está presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer.

De igual manera mis agradecimientos a la **Universidad Autónoma del Estado de Morelos**, por ser la sede de todo el conocimiento adquirido en estos años, a toda la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías y a mis profesores** quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a la **directora Dra. Viridiana Aydeé León Hernández**.

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal del **Centro de Investigaciones Químicas** por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso de investigación dentro de su establecimiento educativo.

### **Gracias a Mi comité Revisor**

De manera especial a mi **tutora de tesis, la Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez** por haberme guiado, no solo en la elaboración de este trabajo de titulación, sino que también en el apoyo para desarrollarme laboralmente, gracias a su experiencia, conocimientos y motivación hoy puedo sentirme dichosa y contenta.

Sin embargo, merecen agradecimiento y reconocimiento especial **mi Madre y mi Padre** que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible. No tengo palabras para agradecerles las incontables veces que me brindaron su apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, unas buenas, otras malas, otras locas. Gracias por darme la libertad de desenvolverme como ser humano.

A toda mi familia y a mis amigos que gracias a su apoyo motivacional y moral me permitieron permanecer con empeño, dedicación y cariño, y a todos quienes contribuyeron con un granito de arena para culminar con éxito la meta propuesta.

## DEDICATORIAS

Dedico esta tesis principalmente a Dios, por haberme dado la vida, estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi madre, **Emma Pérez Carrillo** por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. A mi padre, **Cesar Alvarado Téllez** que a pesar de nuestras diferencias de opinión siempre me apoya. Ellos son mis pilares de la vida, les dedico este trabajo de titulación.

A mi **tutora de tesis, la Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez** que con su amplia experiencia y conocimientos me orientaron al correcto desarrollo y culminación con éxito este trabajo para la obtención de la Licenciatura, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

Esta tesis está dedicada también en memoria de mi hermano **Rigoberto Alvarado Pérez**, quién me animó en este campo de estudio. A pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí. Tras tu muerte prematura, la vida me dio una nueva apreciación del significado y la importancia de cada minuto vivido.

No menos importante a mi Hermano **Cesar Alvarado Pérez**, y a mis hermosas hermanas **Ariana Lizbeth Alvarado Pérez** y **Amaya Margarita Alvarado Pérez**, por llenarme de alegría día tras día, por todos los consejos brindados, por las peleas, los gritos y herir mi cuerpo de puro amor.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).</b>	<b>11</b>
<b>2.1.1. Partes del HPLC.</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Método Analítico</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1 Desarrollo de métodos analíticos.</b>	<b>15</b>
<b>2.2.2 Clasificación de métodos analíticos.</b>	<b>16</b>
<b>2.3. Validación de métodos analíticos</b>	<b>17</b>
<b>2.3.1. Parámetros de validación</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2. Verificación del sistema</b>	<b>18</b>
<b>2.3.3. Linealidad y Rango</b>	<b>19</b>
<b>2.3.4. Límites de detección Cuantificación</b>	<b>19</b>
<b>2.3.5. Precisión</b>	<b>20</b>
<b>2.3.5.1. Repetibilidad</b>	<b>21</b>
<b>2.3.5.2. Precisión Intermedia</b>	<b>21</b>
<b>2.2.5.3. Reproducibilidad</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Aplicación del método analítico HPLC para el desarrollo de nuevos fármacos.</b>	<b>23</b>
<b>2.5. Fuentes naturales para la obtención de nuevos fármacos</b>	<b>24</b>
<b>2.6. <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. (Chapulixtle)</b>	<b>25</b>
<b>2.6.1. Descripción botánica.</b>	<b>26</b>
<b>2.6.2. Nombres comunes</b>	<b>27</b>
<b>2.6.3. Distribución geográfica.</b>	<b>27</b>
<b>2.7. Metil dodonato A</b>	<b>29</b>
<b>2.5.1. Propiedades físicas, químicas, farmacológicas y formulación del analito</b>	<b>30</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>33</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>34</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>5.1. Objetivo general</b>	<b>34</b>
<b>5.2. Objetivos particulares</b>	<b>34</b>

<b>6. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>35</b>
<b>7. DISCUSIÓN Y RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>67</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>68</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema de los componentes de un HPLC.

**Figura 2.** Columna para HPLC.

**Figura 3.** Precisión y sus diferentes tipos de estudios.

**Figura 4.** Especie vegetal *Dodonaea viscosa*. A. Planta; B. Frutos; C. Semillas. (Fotografías tomadas por Córdova-Ocampo, D. 2020).

**Figura 5.** Mapa de distribución de la especie vegetal *Dodonaea viscosa* en la República Mexicana.

**Figura 6.** Estructura química de los compuestos metil dodonatos A, B y C.

**Figura 7.** Diluciones.

**Figura 8.** Cromatografía en Capa Fina Fase Normal

**Figura 9.** Cromatografía en Capa Fina Fase Reversa

**Figura 10.** Diluciones a temperatura ambiente.

**Figura 11.** Espectrofotómetro UV/VIS.

**Figura 12.** Equipo HPLC.

**Figura 13.** Efecto de la temperatura sobre el tiempo de retención y la forma del pico. Separación isocrática de acetona y alquilfenonas C2-C4 en metanol-agua 60:40 en una columna Symmetry<sup>R</sup> C<sub>18</sub> de 2.1 x 30 mm. (Li, J.B. Waters Corporation, Milford, MA. 1999).

**Figura 14.** Resultado de cromatograma (Blanco).

**Figura 15.** Cromatograma con concentración de 1.56 µm/mL.

**Figura 16.** Cromatograma con concentración de 3.125 µm/mL.

**Figura 17.** Cromatograma con concentración de 6.25 µm/mL.

**Figura 18.** Cromatograma con concentración de 12.5 µm/mL.

**Figura 19.** Cromatograma con concentración de 25 µm/mL.

**Figura 20.** Cromatograma con concentración de 50 µm/mL.

**Figura 21.** Cromatograma con concentración de 100 µm/mL.

**Figura 22.** Cromatogramas conforme a las diferentes concentraciones.

## LISTA DE GRÁFICAS

**Gráfica 1.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 1er vez.

**Gráfica 2.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 2da vez.

**Gráfica 3.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 3er vez.

**Gráfica 4.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 4ta vez.

**Gráfica 5.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 5ta vez.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Factores de variación en el estudio de la precisión.

**Tabla 2.** Actividad antiinflamatoria de Metil Dodonato A.

**Tabla 3.** Solventes, Material y equipo utilizado.

**Tabla 4.** Valores de  $R^2$  para las rectas empleadas en el proyecto.

**Tabla 5.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 1 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 1er vez.

**Tabla 6.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 2 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 2da vez.

**Tabla 7.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 3 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 3ra vez.

**Tabla 8.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 4 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 4ta vez.

**Tabla 9.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 5 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 5ta vez.

**Tabla 10.** Se presentan los resultados obtenidos de LD y LC.

**Tabla 11.** Resultados obtenidos de los cromatogramas analizados el día 1.

**Tabla 12.** Resultados obtenidos de los cromatogramas analizados el día 3.

**Tabla 13.** Resultados de tiempo de retención (RT) en minutos Dia 1.

**Tabla 14.** Resultados del tiempo de retención (RT) en minutos del día 3.



**ABREVIATURAS**

AUC	Área bajo la curva
BP	Buenas Prácticas
CNQFB	Colegio Nacional de Químicos Farmaco Biólogos
EUOPEA	<i>European Pharmacopoeia</i>
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LTIUVa	Laboratorio Técnico Industrial de la Universidad de Valencia
LD	Límite de Detección
LC	Límite de Cuantificación
m	Metro
mg	Miligramo
µg	Microgramo
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mm	Milímetro
$t_r$	Tiempo de retención
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

## 1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica indispensable en la industria Química y Farmacéutica; su aplicación permite la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla.

El realizar un análisis por HPLC en la industria farmacéutica es una necesidad y de un uso rutinario, esta técnica evita errores, reduce repeticiones analíticas y facilita la rapidez en los análisis, pero sobre todo proporcionan confiabilidad a los productos analizados cuando se aplica un método analítico validado.

La validación de métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros; la validación en si proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer y confirma las cuantificaciones realizadas.

Las actividades de desarrollo y validación de métodos analíticos están estrechamente ligadas; muchas de las características de desempeño que se evalúan durante el desarrollo del método, también lo son en mayor o menor medida de la validación siguiendo las indicaciones de las normas oficiales y las Farmacopeas cuando se trata de fármacos comerciales.

En la Investigación de productos naturales con aplicación terapéutica, al ser nuevos compuestos, no cuentan con el desarrollo y validación de un método analítico preciso y confiable; por ello, en este caso se desarrolló y validó un método analítico por HPLC para el compuesto metil dodonato A, que ha demostrado experimentalmente *in vivo* propiedades antiinflamatorias.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (*High Performance Liquid Chromatography*).

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La cromatografía líquida se lleva a cabo empleando una columna; después se coloca la muestra por la parte inicial de la misma y se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de gravedad cuando se trata de cromatografía en columna abierta. Para aumentar la eficiencia en las separaciones, en cromatografía líquida de alta resolución; modifica la columna con soportes específicos de acuerdo con la naturaleza de la muestra y el tamaño de las partículas de fase fija se disminuye hasta los micrones, usando altas presiones para lograr que la fase móvil fluya y logre la separación de los componentes de la muestra.

En la actualidad HPLC ha llegado a ser una de las Técnicas del Laboratorio Moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema; por lo cual es indispensable la reproducibilidad y la validación. (Loro, J. F., 2001). Los componentes de un equipo HPLC puede representarse como se muestra en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Esquema de los componentes de un HPLC.

### **2.1.1 Partes del HPLC**

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

#### **A) Depósitos para la fase móvil (disolventes)**

Como algunas de las fases móviles utilizadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable (Hernández L. 2002).

Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos. Deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio.

Los recipientes que se utilicen para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil (Harris,. 2001).

#### **B) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil**

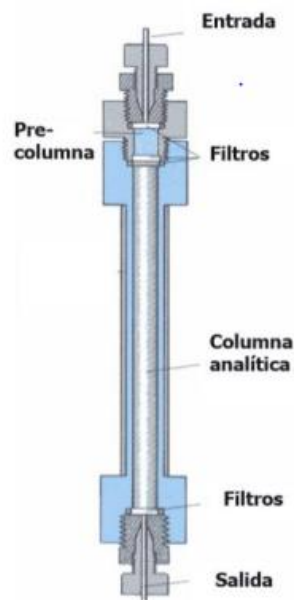
Bombas de desplazamiento o tipo jeringa, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 ml. (Harris, D.C. 2001)

### C) Sistema de inyección de muestras

Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. El método más simple es la utilización de una jeringa de alta presión con un diafragma (“septum”) a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de operación de 1500 psi. (Harris, D. C. 2001).

### D) Columna cromatográfica

En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación (Harris, D. C. 2001). El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10  $\mu\text{m}$  (Harris, D. 2001). (Ver **Figura 2**)



**Figura 2.** Columna para HPLC.

Las columnas suelen ser costosas y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra columna más corta, denominada la precolumna, y estas deben estar siempre tapadas con sus tapones.

## **E) Detectores**

El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura. (Hernández, L. 2002)

El detector responde a la concentración del soluto y se registra en función del tiempo y obteniéndose una serie de picos, generándose un gráfico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

Se pueden clasificar de la forma siguiente:

**Detector de fluorescencia:** existen dos tipos de instrumentos

>Fluorómetros: Utilizan como fuente una lámpara de Hg a baja presión, que funciona a 254, 546, 691, 793 nm, estas longitudes de onda se aíslan con filtros y un tubo fotomultiplicador es cual es el detector.

>Espectrofluorómetros: La fuente empleada es una lámpara de arco de xenón, de alta presión, se necesita radiación continua de 300 a 1300 nm, son de doble haz, tienen dos sistemas de monocromación para aislar la longitud de onda deseada.

**Detector de índice de refracción:** Son universales y responden a todos los solutos, son muy sensibles a los cambios de temperatura, pero no así a la concentración.

**Detector electroquímico:** se considera casi como universal, es muy sensible a la concentración porque emplea medidas de corriente.

**Detectores de luz dispersa tras evaporación (ELSD):** Demuestran su utilidad en la determinación de pesos moleculares de polímeros y péptido.

**Detectores de absorbanza ultravioleta:** Son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbanza se representan en función de la longitud de onda y del tiempo. (Harris, D. C. 2001)

## **2.2 Método Analítico**

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de una muestra. (Guía de validación de métodos analíticos edición 2019 CNQFB).

### **2.2.1 Desarrollo de métodos analíticos.**

El trabajo de validación está precedido de una fase de desarrollo que incluye a diferentes miembros del personal y que puede realizarse de varias formas. Por un lado, puede implicar la adaptación de un método ya existente realizando cambios menores para adecuarlo a una nueva aplicación. (Guía de validación de métodos analíticos edición 2019 CNQFB).

Por otro lado, el químico analítico puede comenzar a esbozar algunas ideas y aplicar su conocimiento y experiencia para idear un método adecuado. Esto

implica claramente mucho más trabajo y más dudas sobre la idoneidad del método final. No es inusual para el desarrollo del método trabajar con varias ideas simultáneamente antes de elegir finalmente la más adecuada. A pesar del esfuerzo invertido en el desarrollo del método, no hay ninguna garantía de que el método vaya a funcionar adecuadamente durante la validación (o bajo condiciones de rutina en un laboratorio particular). (Guía de validación de métodos analíticos edición 2019 CNQFB). Por la diversidad de métodos analítico por desarrollar, se ha considerado su clasificación.

## **2.2.2 Clasificación de Métodos analíticos**

En función de su estado regulatorio en:

- Métodos Farmacopeicos. Todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, EUOPEA, entre otras.).
- Métodos No Farmacopeicos. Aquellos métodos no compendiados en una farmacopea.

En función de la naturaleza de la respuesta analítica en:

- Métodos físico-químicos. Cuando la respuesta es de carácter físico (Absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones -OH, consumo de un acomplexante, etc.)
- Métodos biológicos. Cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de un microorganismo, protección, muerte, entre otras.).

En función de su propósito analítico en:

- Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia).
- Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.
- Métodos para identificar el analito.

(Guía de validación de métodos analíticos edición 2002 CNQFB)



### 2.3. Validación de métodos analíticos

La validación dentro de la industria farmacéutica, es la confirmación del producto de calidad a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto. El laboratorio debe validar todos los métodos tanto los métodos no normalizados como los métodos que desarrolla y los métodos empleados fuera del alcance previsto en un sistema de gestión de calidad; también deben considerarse las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo o campo de aplicación, en este caso en la aplicación farmacéutica.

El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación de un método para demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. NMX-EC-17025-IMNC-2006

Se pueden validar:

- Métodos no normalizados;
- Métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio;
- Métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación;
- Ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados.

La extensión ('alcance') de la validación dependerá de la aplicación, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar. También debe validarse cuando es necesario demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos por dos métodos, por ejemplo, un método recientemente desarrollado y un método normalizado existente. NMX-EC-17025-IMNC-2006

### **2.3.1. Parámetros de validación**

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Los parámetros analíticos considerados en validación son: Verificación del sistema, linealidad y rango, precisión y veracidad, exactitud, entre otros. (OMS, 2002)

### **2.3.2. Verificación del sistema**

Las pruebas de verificación del sistema se basan en el concepto de que: el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que van a ser analizadas contribuyan a un sistema integral, que puede ser evaluado como tal.

La **verificación del sistema** son pruebas utilizadas para verificar que el sistema funciona correctamente, con base en criterios establecidos previamente. Esta verificación permite establecer la confiabilidad del sistema, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método; también se conoce como buen o correcto funcionamiento del sistema. En función del sistema de medición, se deben establecer las características relacionadas con su funcionamiento correcto, basadas en el tipo de equipo e instrumentación utilizado en el método. Estas pueden ser definidas en función de una respuesta analítica, como pueden ser sus propiedades, su variabilidad, su forma, su tiempo de respuesta, indicadores de separación, indicadores de eficiencia, respuesta de blancos, entre otros. En la fase del desarrollo del método, las características mencionadas anteriormente y sus criterios de aceptación deben ser establecidas; durante la validación, la verificación debe ser únicamente verificada. (FEUM, 2018)

### **2.3.3. Linealidad y Rango**

La **linealidad** es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación. El **rango** se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuales son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de las especificaciones. (FEUM, 2018)

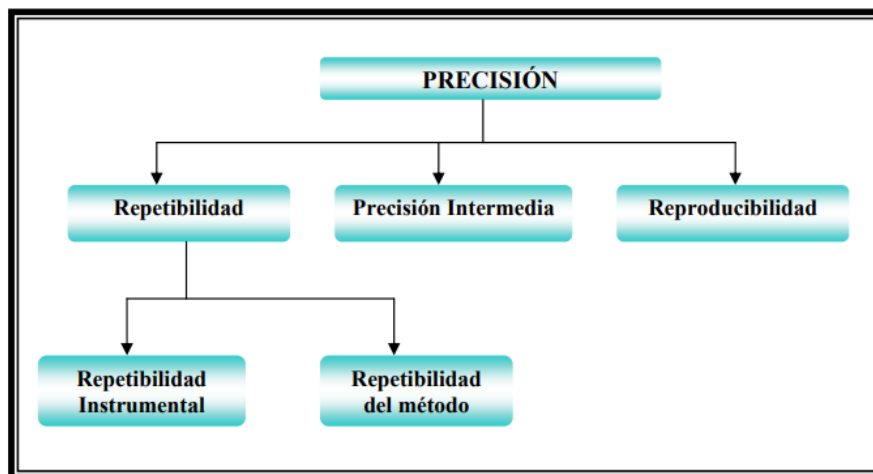
### **2.3.4. Límites de Detección y Cuantificación**

El **límite de Detección** es un parámetro de prueba límite. Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas en dicho método. Considerándose como LD la concentración que produce una señal al menos tres veces superior al ruido de fondo ( $S/N > 3$ ).

El **límite de Cuantificación** se define como un parámetro para ensayos cuantitativos de bajos niveles de compuestos en matrices de muestras, tales como impurezas en muestras activas o productos de degradación en productos terminados. Es la concentración de muestra en un analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones experimentales establecidas. (Soledad Rodríguez, B.E. 0000)

### 2.3.5. Precisión

La **precisión (Figura 3)**, expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio. El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más – menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de ensayo no pueden ser siempre controlados (analistas, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión. La precisión engloba diferentes tipos de estudio: (FEUM, 2018)



**Figura 3.** Precisión y sus diferentes tipos de estudios.

### **2.3.5.1. Repetibilidad**

Grado de concordancia relativa entre una serie de medidas obtenidas por muestreo múltiple de una misma muestra homogénea en las mismas condiciones de análisis en un intervalo corto de tiempo. (Guía de validación de métodos analíticos, edición 2002)

### **2.3.5.2. Precisión Intermedia**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio. En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente si no que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos. (FEUM, 2018)

### **2.3.5.3. Reproducibilidad**

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas, pero siguiendo el procedimiento descrito en el método. (FEUM, 2018) En la **tabla 1**, se presentan los factores de variación en el estudio de la precisión considerando en donde es posible tener una igualdad o diferencia dependiendo el factor y la variable.

<b>Factores</b>	<b>Repetibilidad</b>	<b>Precisión Intermedia</b>	<b>Reproducibilidad</b>
Instrumento	Igual	Diferente	Diferente
Día de análisis	Igual	Diferente	Diferente
Analista	Igual	Diferente	Diferente
Otros factores (por ejemplo: Columnas, Reactivos, condiciones ambientales)	Igual	Diferente	Diferente
Laboratorio	Igual	Igual	Igual

**Tabla 1.** Factores de variación en el estudio de la precisión.

### **Análisis de datos**

a) En el caso de la precisión

Calcular la media ( $\gamma$ ), desviación estándar ( $\delta$ ) y coeficiente de variación (CV)

b) En el caso de la exactitud:

Calcular el porcentaje de recobro (%R). Para calcular el porcentaje de recobro se debe calcular:

- I. Promedio aritmético ( $\bar{y}$ )
- II. Desviación estándar ( $\delta$ ).
- III. Con el coeficiente de variación (CV).
- IV. El intervalo de confianza para la media poblacional (IC ( $\gamma$ ))

c) En el caso de la linealidad:

Con el coeficiente de determinación ( $r^2$ )

d) En el caso de Limite de Cuantificación y Detección

Límite de Detección ( $C_L$ ) y Limite de Cuantificación ( $C_m$ )

- I. Desviación de blanco ( $S_B$ )

## II. Promedio de pendientes ( $m$ )

### e) En el caso de la reproducibilidad:

Se evalúa por medio del coeficiente de variación de todos los resultados analíticos, el cual debe cumplir con el criterio de aceptación establecido.

La magnitud de la repetibilidad debe satisfacer el criterio de aceptación establecido, en función de la aplicación analítica del método, de la naturaleza del sistema y de la complejidad del método, entre otras.

## **2.4. Aplicación del método analítico HPLC para el desarrollo de nuevos fármacos**

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), es la técnica escogida para aislamiento y purificación de productos de valor en la industria química y farmacéutica, así como en la biotecnología y la bioquímica. Esto es posible con columnas preparativas que comprenden un amplio rango de aplicaciones, desde el aislamiento de 1  $\mu\text{g}$  de muestra para identificación espectroscópica hasta el aislamiento de un compuesto puro de una mezcla de 100 g. (LTIUVa, 2022)

El equipo de HPLC se utiliza en la industria médica y farmacéutica para analizar productos y los excipientes que se usan para elaborar las presentaciones farmacéuticas. A menudo, este análisis lo desarrolla el laboratorio de control de calidad de la empresa farmacéutica. El beneficio para la empresa farmacéutica en el uso del HPLC es la seguridad en la calidad que brinda este análisis, otro beneficio es que los métodos HPLC son relativamente estándar en la industria y se deben cumplir estándares de calidad de acuerdo con normativas nacionales e internacionales. (Faulkner, B. 2021)

## 2.5. Fuentes naturales para la obtención de nuevos fármacos

En la actualidad, la OMS estima que el 80 % de la población de países en desarrollo basa el cuidado de su salud en la medicina tradicional; del 20 % restante, en más del 25 % de los casos usa fármacos que han sido derivados de productos naturales.

La importancia histórica del uso de productos naturales como fármacos o como modelos para el desarrollo de fármacos es innegable; asimismo, es bien reconocido el potencial de los recursos naturales como fuentes de futuros productos farmacéuticos. De los 1184 productos que se incorporaron al mercado como nuevos fármacos durante el periodo de 1981 a 2006, el 5 % correspondió a productos naturales con estructuras novedosas; el 23 % se obtuvo como derivados de estos; el 10% correspondió a nuevas moléculas moldeadas a partir de productos naturales; y el 4% a moléculas de productos naturales obtenidos por síntesis química (Newman y Cragg, 2019).

Los productos naturales y sus análogos estructurales históricamente han hecho una contribución importante a la farmacoterapia, especialmente para el cáncer y las enfermedades infecciosas. Sin embargo, los productos naturales también presentan desafíos para el descubrimiento de fármacos, como barreras técnicas para la detección, el aislamiento, la caracterización y la optimización, lo que contribuyó a una disminución en su búsqueda por parte de la industria farmacéutica desde la década de 1990 en adelante. En los últimos años, se está revitalizando el interés en los productos naturales como fármacos líderes, en particular para combatir la resistencia a los antimicrobianos y otras enfermedades que aquejan a la humanidad. (Atanas G. Atanasov, *et al.* 2021)



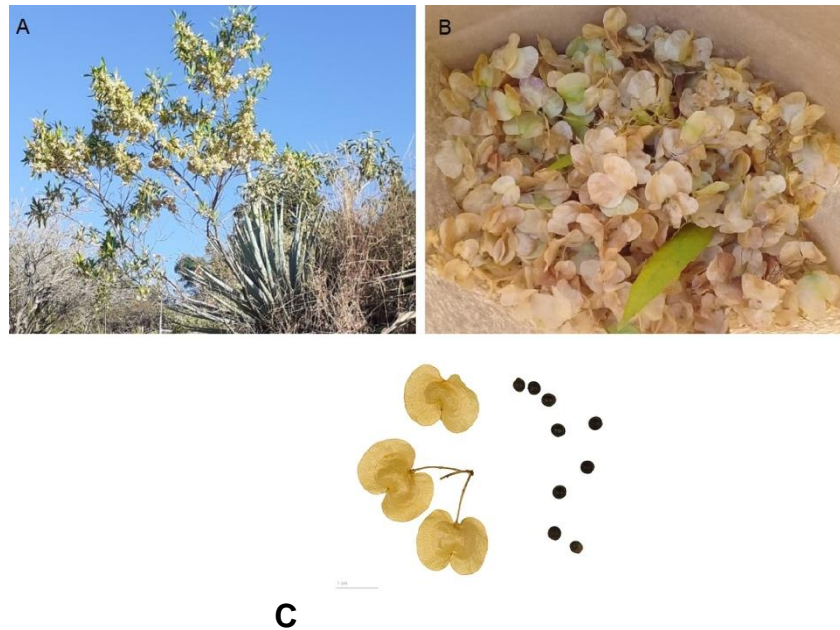
## 2.6. *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. (Chapulixtle)

La planta *Dodonaea viscosa* es conocida comúnmente como Chapulixtle (**Figura 4**), por el conocimiento etnomédico en nuestro país, es utilizada para padecimientos de reumas y dolores de cintura. Sus hojas sirven para baños de parturientas (cuidados de la mujer en la etapa de puerperio). Se menciona que la infusión de la corteza de la planta es utilizada para el tratamiento de enfermedades venéreas, fiebre, cólicos, gota, dolores de piezas dentarias e infecciones de la garganta. Por sus propiedades cicatrizantes se utiliza para el tratamiento de heridas y picaduras de insectos. Las formas de preparación y utilización son diversas (infusión, cataplasmas o vaporizaciones).

En la región centro del país, el uso medicinal de *D. viscosa* es importante, ya que el 98.7 % de las mujeres en edad reproductiva y después del parto (cuidados en la etapa de puerperio) utilizan el chapulixtle y otras plantas medicinales para evitar enfriamientos en el aparato reproductor femenino. El 53.9 % de la población -hombres y mujeres- mayores de 35 años la emplean mezclada con partes de otras plantas y sustancias como alcohol para el tratamiento de padecimientos artríticos; en menores proporciones es utilizada para el tratamiento de infecciones de la piel y enfermedades gastrointestinales.

La mayor frecuencia de uso medicinal corresponde a las mujeres. La medicina tradicional en la región es importante, ya que auxilia en la solución de problemas de salud, principalmente en lugares donde no existen servicios médicos o la accesibilidad a éstos no es fácil. (Juan-Pérez, J. I. *et al*, 2010)

Como se ha mencionado, de esta especie se han aislado compuestos con interés terapéutico; por lo cual, conocer más sobre la planta permitirá resaltar su valor etnomédico y su localización dentro de la biodiversidad del país.



**Figura 4.** Especie vegetal *Dodonaea viscosa*. A. Planta; B. Frutos; C. Semillas. (Fotografías tomadas por Córdova-Ocampo, D. 2020).

### **2.6.1. Descripción botánica.**

Este arbusto es uno de las plantas más comunes sobre terrenos degradados, sobre todo en el trópico seco. (Rzedowski y Rzedowski, 2001)

Sinónimo: *Ptelea viscosa* L.

Nombre científico: *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq

Nombre común: Granadillo, Dodonea

Familia: Sapindaceae

Orden: Sapindales

Subclase o clase: Rosidae

### 2.6.2. Nombres comunes

Nombres comunes contemporáneos: Aria, cuerno de cabra, chapulistle, chapuliz, granadina, guayabillo, hierba de la cucaracha, huesito, jarilla, munditos, ocotillo, palomilto, tapa chile, tarachico (Martínez, 1979).

Nombres comunes en idiomas indígenas de México: Qui-laga-cijti (lengua zapoteca), huayun-ak (en maya, pirumu (lengua tarasca), salté (lengua tojolobal), tonalcotl-xihuitl y tonalocotl-xihuitl (náhuatl). (Martínez, M. 1979)

### 2.6.3. Distribución geográfica.

Área de origen: América. Distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Sudamérica.

Distribución secundaria: África, Asia y Oceanía.

Distribución en México: Se ha registrado en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán (Villaseñor y Espinosa, 1998), ver **Figura 5**.



**Figura 5.** Mapa de distribución de la especie vegetal *Dodonaea viscosa* en la República Mexicana.

Estatus migratorio en México: Nativo.

Descripción técnica: Basada en Rzedowski y Rzedowski, 2001.

Hábito y forma de vida: Arbusto perennifolio, muy resinoso, pegajoso.

Tamaño: De hasta 3 m de alto.

Planta: arbusto; 1-3 m de alto, dioico o raramente poligamodioico; corteza áspera; ramas jóvenes escasamente puberulentas.

Hojas: simples, esencialmente sésiles, lineales a oblanceoladas, 3.5-10 cm de largo, 0.3-1.5 cm de ancho, que se estrecha gradualmente hasta la base, coriáceas, subglabras, con glándulas planas, los márgenes con pelos cortos y rectos dispersos, muy ligeramente revolote; vena media prominente; venas laterales oscuras arriba, débilmente evidentes debajo.

Inflorescencia: generalmente racemosas, escasamente puberulentas, 6-14 mm de largo; brácteas 2-5 mm de largo.

Flores: amarillo pálido, 3-5 mm de ancho; pedicelos de 5-12 mm de largo; sépalos 4-5, 1-3 mm de largo, lanceolados, elípticos-ovados, agudos, glabros o los márgenes ciliados; ovario en flores con pistilo viscoso, el ginóforo de 1 mm de largo; estambres en flores portadoras de estambres (5-) 8-10 (-12), los filamentos de 0.5 mm de largo, las anteras de 1.5-2 mm de largo con algunos pelos setosos en el ápice.

Frutos y semillas: El fruto es seco, una cápsula con 3 alas.

Hábitat: En comunidades secundarias, etapas sucesionales de bosques perturbados (especialmente encinares y matorrales xerófilos) y tipos de vegetación mesófila, bordes de arroyos, barrancos y taludes, claros de bosque, lugares expuestos, pastizales deteriorados, terrenos erosionados y matorrales (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

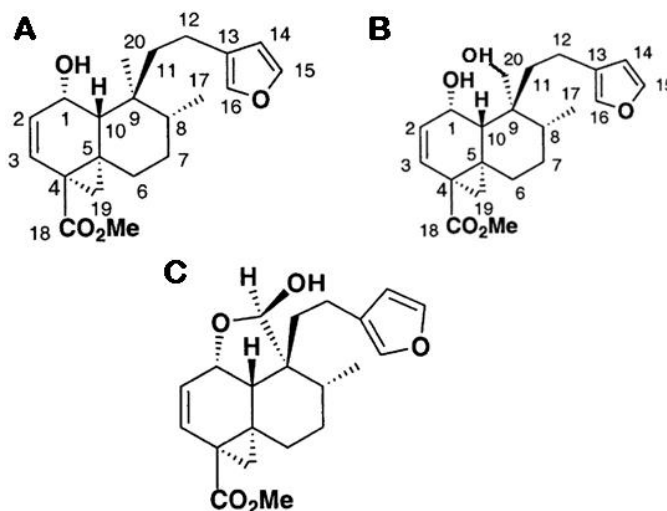
Distribución por tipo de zonas bioclimáticas: Selva baja caducifolia, bosque de pino-encino, matorrales xerófilos.

Propagación, dispersión y germinación: Dispersa con el viento.

Ciclo de vida: Planta perenne.

## 2.7. Metil dodonato A

De las hojas frescas de *D. viscosa* se obtuvieron por extracción con acetato de etilo los compuestos metil dodonato A, B y C, entre otros compuestos de tipo clerodano (Ortega, A. *et al*, 2001). (Figura 6)



**Figura 6.** Estructuras de los metil dodonatos. Metil dodonato A, B y C.

El compuesto de interés para el presente proyecto es Metil dodonato A (MDA), compuesto que ha mostrado actividad antiinflamatoria in vivo y que continua como objeto de estudio en el laboratorio 325 del Centro de Investigaciones Químicas del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la responsabilidad de la Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez. A continuación se presentan las propiedades de dicho compuesto y avances en su investigación.

### **2.7.1. Propiedades físicas, químicas, farmacológicas y formulación en nanoemulsión del analito**

A continuación, se presentan las propiedades físicas, químicas y farmacológicas del analito en estudio tomando las referencias de Ortega, A. *et al.*, 2001, Domínguez-Villegas, V., *et al.*, 2017 y Lucena, P., *et al.*, 2018.

**Nombre Químico:** Metil Dodonato A

**Fórmula Molecular:**  $C_{21}H_{28}O_4$

**Peso Molecular:** 344.23175 g/mol

**Solubilidad:** Prácticamente insoluble en hexano; libremente soluble en diclorometano, metanol, en acetonitrilo, y mezcla acetonitrilo agua.

**Características Físicas:** Sólido cristalino incoloro e inodoro. Funde a aproximadamente entre 132-133 °C.

**Datos espectroscópicos y espectrométricos:**  $[a]_D = + 39^\circ$  (c 0.15,  $CHCl_3$ ); IR ( $CHCl_3$ )  $V_{max}$ : 3470, 1717, 1650, 1500, 873  $cm^{-1}$ ; EIMS a m/z 344 [M] [M]<sup>+</sup>, 326, 312, 297, 283, 245, 203, 189, 162, 149, 121, 95, 81. RMN <sup>1</sup>H (300 o 500 MHz):

$\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , m, (J): H-1: 4.47 *dd* (6.3, 4.2), H-2: 5.75 *dd* (9.9, 6.3); H-3: 6.46 *d* (9.9) H-6: 1.56 *ma*; H-7: 1.42 *ma*; H-8 1.62 *ma*; H-10: 1.68 *d* (4.2); H-11: 1.93 *ddd* (14.7, 12.9, 4.2) y 1.78 *ddd* (14.7, 12.9, 5.4); H-12: 2.43 *td*; (14.7, 5.4) y 2.31 *td* (14.7, 4.2); H-14: 6.27 *dd* (1.7, 0.9); H-15: 7.35 *t* (1.7); H-16: 7.22 *brs*; H-17 0.87 *d* (6); H-19<sub>pro-R</sub> 1.94 *d* (4.5); H-19<sub>pro-S</sub> 1.59 *d* (4.5); H-20: 1.15 *s* y OMe: 3.72 *s*. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 o 125 MHz):  $\delta$ , m: C-1: 64.5 *d*; C-2: 124.7 *d*; C-3: 131.4 *d*; C-4 30.1 *s*; C-5: 34.1 *s*; C-6: 31.9 *t*; C-7: 29.5 *t*; C-8 38.3 *d*; C-9: 40.8 *s*; C-10 43.3 *d*; C-11: 37.8 *t*; C-12 17.9 *t*; C-13 125.4 *s*; C-14: 110.9 *d*; C-15: 142.8 *d*; C-16 138.4 *d*; C-17: 15.0 *q*; C-18 172.6 *s*; C-19: 32.8 *t*, C-20 17.3 *q*; OMe 52.1 *q*. (Ortega, A. *et al*, 2001).

**Propiedades farmacológicas:** Se le ha demostrado actividad antiinflamatoria en un modelo *in vivo* de inflamación con TPA en oreja de ratón considerable en el laboratorio 325 del Centro de Investigaciones Químicas del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se estudió la actividad antiinflamatoria de los diterpenos metil dodonatos A y B, evaluados en un modelo *in vivo* de inducción de la inflamación con TPA en oreja de ratón. Como resultado de la evaluación antiinflamatoria se encontró que el porcentaje de inhibición de la inflamación para metil dodonato A fue:  $80.47 \pm 2.53$  y para metil dodonato B  $85.87 \pm 1.10$ , observando una actividad antiinflamatoria considerablemente alta (Domínguez-Villegas, V., *et al.*, 2017).

**Formulación en nanoemulsión:** Para el desarrollo de medicamentos se requiere de la preparación de diferentes presentaciones farmacéuticas. En el caso de los metil dodonatos A, B y C (**Figura 7**), se prepararon formulaciones nanoestructuradas para que logren una buena solubilidad y estabilidad fisicoquímica para poder atravesar las barreras fisiológicas y lograr una buena biodisponibilidad en su aplicación percutánea. Las nanoemulsiones suelen tener un tamaño de gota inferior a 1  $\mu\text{m}$  con una baja tensión interfacial. Para los metil dodonatos A, B y C se formularon en dos nanoemulsiones: nanoemulsión base labrasol (NEBL) y nanoemulsión base aceite de castor (NEBAC). Dichas formulaciones se

caracterizaron para identificar su comportamiento conforme al tamaño de gotícula. La nanoemulsión con dispersante labrasol demostró un comportamiento monomodal y con dispersante de castor un comportamiento bimodal como se muestra en la **Tabla 2** (Lucena, P., *et al.*, 2018).

COMPUESTOS	NEBL Tamaño de gotícula (nm) (Monomodal)	NEBAC Tamaño de gotícula (nm) (Bimodal)
Metil dodonato A	720.8 ± 232.1	2.03 ± 0.50 (63.4 %) 391.30 ± 159.90 (36.6 %)

**Tabla 2.** Actividad antiinflamatoria de Metil Doconato A

**Estudio Biotecnológico:** Córdova, D. 2022, estableció un cultivo controlado de la planta *Dodonaea viscosa*, así como también estableció un cultivo *in vitro* de callos a partir de explante de cotiledón de la misma especie. En estos cultivos se cuantificó la concentración de MDA en hojas de 3 y 6 meses de edad de los cultivos en maceta y en los cultivos de callos para los mejores tratamientos en donde se emplearon reguladores de crecimiento.



### 3. JUSTIFICACIÓN

El producto natural Metil Dodonato A, es un diterpeno de tipo clerodano que fue aislado de la planta medicinal *Dodonaea viscosa* L. Jacq. En investigaciones previas en el laboratorio se ha demostrado su actividad antiinflamatoria en el modelo *in vivo* de inducción de inflamación por TPA en oreja de ratón y resultó con un porcentaje considerable de inhibición de la inflamación. Para la continuidad de las investigaciones que se realizan sobre este compuesto es necesario contar con un método analítico de cuantificación confiable y validado que permita asegurar la repetibilidad y reproducibilidad de dichos análisis, por ello el interés del presente proyecto de investigación y desarrollo. En este proyecto, se propone el uso de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) para el desarrollo, la validación y aplicación de un método analítico que se apegue a lo establecido en la NMX-EC-17025-IMNC-2006 con respecto a sus parámetros de validación.

## **4. HIPÓTESIS**

El método diseñado cumplirá con los parámetros para ser validado y aplicado en la cuantificación de Metil dodonato A en perfiles de diluciones de muestras de concentración conocida y de muestras de prueba.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Diseñar y validar un método de cuantificación por HPLC que permita construir perfiles de disolución de Metil dodonato A de muestras de concentración conocida y este método permita cuantificarlo en muestras de prueba.

### **5.2. Objetivos particulares**

1. Desarrollar un método de análisis por HPLC para metil dodonato A, a partir de la información existente en la literatura como fundamento para el diseño considerando las normas mexicanas y la farmacopea.
2. Demostrar que el método es funcional para cuantificar Metil dodonato A en muestras de concentración conocida y en muestras de prueba.
3. Evaluar la aplicabilidad del método en la construcción de perfiles de disolución de Metil dodonato A para permitir la cuantificación de dicho compuesto en muestras de prueba.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. Acondicionamiento de la muestra

#### 6.1.1. Pureza

Se determinó el grado de pureza del compuesto mediante su punto de fusión empleando un equipo Fisher-Johns

#### 6.1.2. Pruebas de solubilidad

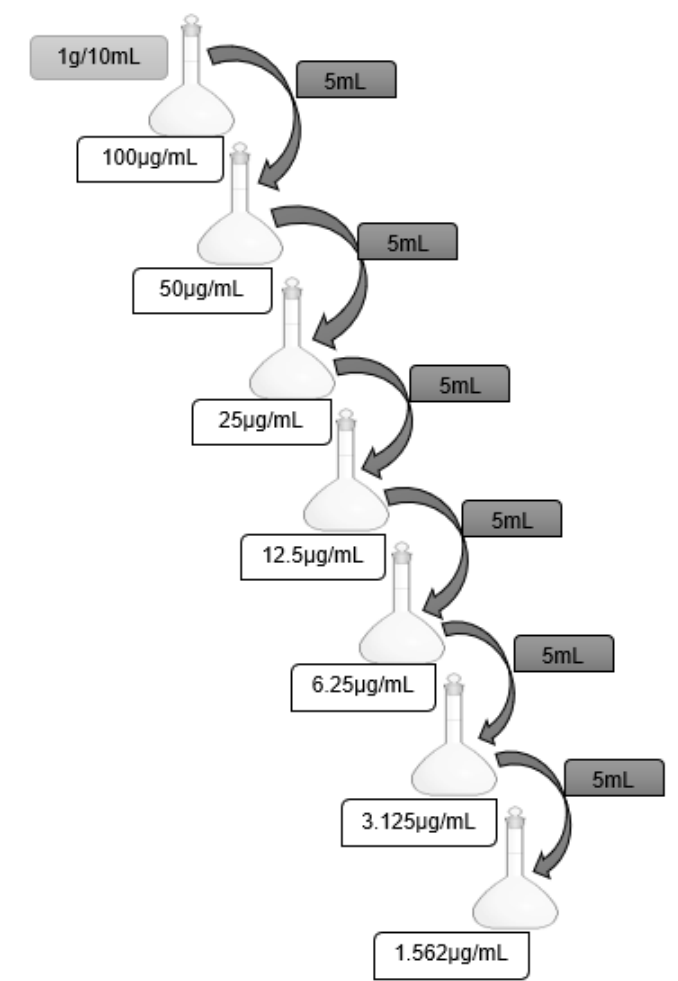
Se realizaron pruebas de solubilidad de la muestra empleando un gradiente de acetonitrilo:agua; disolviendo 1 mg de compuesto en cada una de las pruebas, esto se realizó con una agitación simple y mediante el análisis visual de la disolución.

#### 6.1.3. Cromatografía en Capa Fina Fase Reversa

Se realizaron pruebas cromatográficas en cromatoplasmas fase reversa para establecer a priori un sistema de disolventes que permitiera una resolución efectiva para la detección por UV del Metil dodonato A.

### 6.2. Preparación de las disoluciones

Una vez establecida la identidad del analito, se procedió a la preparación de las disoluciones correspondientes partiendo de la Concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ . En un matraz volumétrico de cristal de 10 mL se pesó 1 mg del compuesto y se llevó al aforo con etanol absoluto, la solución se agitó empleando un agitador vortex; una vez obtenida la solución stock se prepararon las siguientes diluciones: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.625  $\mu\text{g/mL}$ . (**Figura 7**) Estas diluciones se realizaron por quintuplicado.



**Figura 7.** Preparación de las diluciones.

Después cada solución se depositó en viales herméticos con tapón de rosca etiquetados y almacenados a 4 °C, envueltos en papel aluminio para su posterior utilización.

### 6.3. Determinación de la Longitud de onda ( $\lambda_{max}$ ) para Metil dodonato A

Metil dodonato A es un compuesto natural al cual no se le había determinado el valor de su lambda máxima, por ello, se empleó un espectrofotómetro Perkin-Elmer.

Se establecieron las condiciones del análisis para realizar un barrido desde 800 a 200 nm y con ello determinar el valor de la  $\lambda_{max}$ .

#### 6.4. Desarrollo del Método Analítico por HPLC de Metil Dodonato A.

Mediante los resultados obtenidos en los apartados 6.1 a 6.3, se realizó entonces el desarrollo del método analítico de Metil Dodonato A mediante HPLC; una vez establecidas algunas condiciones preliminares, se procedió al análisis de las muestras ya en el equipo HPLC Altus Perkin-Elmer. Se consideró emplear una columna C-18 fase reversa como inicio en el desarrollo del método analítico

Para esquematizar los requerimientos para el desarrollo del método analítico de metil dodonato A, se presenta la **Tabla 3**.

Solventes y reactivos	Material	Equipo
Compuesto Metil Dodonato A (CHAP-2)	Placa para CFR	Lámpara de UV (lambda corta)
Acetonitrilo (ACN)	Tubo capilar	Parrilla
Agua destilada (H <sub>2</sub> O)	Vidrio de reloj	Campana de gases
Etanol	Vaso de precipitado (10 ml)	Balanza analítica
Sulfato cérico amoniacal	Probeta (10 ml)	Agitador Vortex
	Algodón	Espectrofotómetro UV/VIS de lambda de 265 nm de Perkin-elmer
	Matraz volumétrico 10 ml	Equipo de filtración al vacío
	Espátula	Sonicador
	Viales	Equipo HPLC (PerkinElmer, A-10 Solvent & Sample Module Altus)
	Jeringa	UV Detector (PerkinElmer, A-10, Altus).
	Microfiltros de disco 0.45 µm PTFE VWR	
	Celdas de cuarzo	
	Papel parafil	
	Papel tualla	

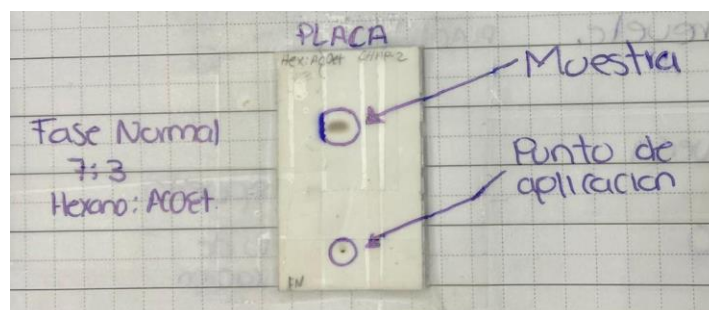
**Tabla 3.** Solventes, Material y equipo utilizado.

## 7. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### 7.1. Acondicionamiento de la muestra

#### 7.1.1. Pureza

Se determinó el punto de fusión del Metil dodonato A (Chap-2) empleando un equipo Fischer-Jonhs; el resultado obtenido fue de 131–133 °C; dato que se correlaciona con el reportado por Ortega, A. *et al*, 2001; adicionalmente, se realizó una cromatografía en capa fina fase normal observar si la sustancia estaba pura como se muestra en la **Figura 8**.



**Figura 8.** Cromatografía en Capa Fina Fase Normal

En las monografías de principios activos que presenta la Farmacopea, se citan generalmente alguno de los siguientes tipos de ensayos de pureza: (1) un ensayo de pureza cromatográfica acompañada de una valoración no específica; (2) un método indicador de la pureza cromatográfica que, además, sirve como valoración, o (3) un ensayo límite específico para una impureza conocida, lo que generalmente requiere una Sustancia de referencia para esa impureza. (Farmacopea, 2018)

Por lo cual con las pruebas realizadas a MDA podrá cumplirse el requerimiento de la Farmacopea si se considera a futuro generar un Dossier de Registro de medicamento. (COFEPRIS, 2022)

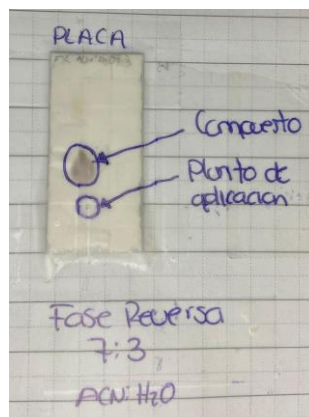
### **7.1.2. Pruebas de solubilidad**

En 6 viales de cristal con tapón hermético se pesó 1 mg de compuesto en cada uno de ellos y se adicionó mediante micropipeta 1 mL de los siguientes sistemas de disolventes: 100 % Acetonitrilo (ACN), 90:10 (ACN:H<sub>2</sub>O), 70:30 (ACN:H<sub>2</sub>O), 60:40 (ACN:H<sub>2</sub>O), 50:50 (ACN:H<sub>2</sub>O) y 100 % H<sub>2</sub>O, empleando disolventes grado HPLC; como resultado de la prueba de solubilidad con agitación simple, se identificó que el sistema 60:40 (ACN:H<sub>2</sub>O) fue el mejor sistema a emplear.

### **7.1.3. Cromatografía en Capa Fina Fase Normal y Fase Reversa**

Primeramente, se realizó un análisis cromatográfico en capa fina fase normal empleando un sistema de elución (70:30 Hex:AcOEt) como se mostró en la **figura 8** muestra la cromatoplaca.

Una vez considerada la solubilidad del analito, se realizaron las correspondientes pruebas de elución en cromatografía en capa fina fase reversa, empleando como fase móvil mezclas de disolventes (ACN:H<sub>2</sub>O); y el sistema (70:30, ACN:H<sub>2</sub>O) fue en el que se obtuvo una resolución aceptable. (**Figura 9**)



**Figura 9.** Cromatografía en Capa Fina Fase Reversa

Con las aproximaciones de solubilidad realizadas fue posible dar pauta para el inicio en el desarrollo del método por HPLC, considerando que al aplicar este sistema de elución el analito podrá fluir sin complicaciones en la columna C-18 utilizada.

## 7.2. Preparación de las disoluciones

Se pesó 1 mg del compuesto Metil dodonato A en 5 diferentes matraces volumétricos de 10 mL y se aforaron con Etanol absoluto, agitando con la ayuda de un Vortex, estas disoluciones correspondieron a las soluciones Stock de partida para la preparación de las 5 series de diluciones que a continuación se denominarán Rectas (R1, R2, R3, R4 y R5).

A partir de cada solución Stock se tomaron 5 mL y se colocaron en otro matraz volumétrico de 10 mL con ayuda de pipetas graduadas de 10 mL, se aforó y se agitó con la ayuda del Vortex; este procedimiento se repitió en los demás matraces obteniendo las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125



y 1.625  $\mu\text{g/ml}$  para las 5 rectas. En la **Figura 10** se observan los viales herméticos con tapón de rosca.



**Figura 10.** Diluciones a temperatura ambiente.

De cada una de las diluciones etiquetadas se tomó 1 mL para colocarlo en los viales del HPLC; dichas muestras fueron filtradas empleando microfiltros PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ . Una vez obtenidas todas las muestras correspondientes se cerraron herméticamente y se les colocó parafilm y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.

### **7.3. Determinación de la Longitud de onda ( $\lambda_{\text{max}}$ ) para Metil dodonato A**

Posteriormente, se prepararon las concentraciones para su lectura primeramente en el espectrofotómetro UV/VIS Perkin-Elmer (**Figura 11**) y obtener el valor de la longitud de onda máxima para metil dodonato A ( $\lambda_{\text{max}}$ ).



**Figura 11.** Espectrofotómetro UV/VIS

Para estabilizar la frecuencia de la lámpara del equipo se prendió 30 minutos antes de su empleo, para dar inicio al análisis, se abre el programa previamente creado y se realiza el acondicionamiento de la línea base con etanol absoluto como el blanco, después se realiza el barrido de la concentración 25  $\mu\text{g/mL}$  para encontrar su lambda máxima.

Se determinó que el valor de lambda máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) que fue de 213 nm.

Al conocer la lambda máxima se acondicionó el espectrofotómetro en la longitud de onda de 213 nm para realizar la medición de la absorbancia de todas las diluciones de cada una de las rectas y así evaluar su coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ).

Cabe mencionar que todos los viales que contenían las 5 diluciones (R1, R2, R3, R4 y R5) se atemperaron en el mismo tiempo en que se encendió el equipo; transcurrido este tiempo, se agitaron cada uno en el Vortex y una vez tomado el volumen de 2 mL fue depositado en la celda de cuarzo con un microfiltro PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro para su análisis. En todos los casos al realizar la lectura a 213 nm la correlación lineal de las diluciones tuvo un valor de  $R^2$  superior a 0.9900; lo cual, fue un indicador preliminar sobre la reproducibilidad y la linealidad de las diluciones podrían presentar también al ser analizadas mediante el equipo de HPLC y permitió comprobar que las diluciones se realizaron de forma correcta. Aun cuando el espectrofotómetro no era el método analítico por desarrollar para metil dodonato A, fue una estrategia importante para un desarrollo novedoso para metil dodonato A que permitirá analizar a posterior el resto de metil dodonatos (B y C); adicional a ello debe recordarse que también se verifica la precisión del operador para la reproducibilidad de los experimentos. Estas mismas rectas (R1-R5) se emplearon en el desarrollo del método analítico por HPLC.

#### **7.4. Desarrollo del Método Analítico por HPLC de Metil Dodonato A.**

##### **7.4.1. Fase estacionaria**

Se consideró para el análisis una columna fase reversa ya que el analito tiene un peso molecular por debajo de 2000 Daltons. (Agilent y Química.es), por ello se empleó la columna: SPHERI-5 RP-18.

#### 7.4.2. Preparación de la fase móvil

De acuerdo con el ensayo de solubilidad realizado, los disolventes empleados fueron acetonitrilo y agua grado HPLC, considerando la solubilidad del analito.

Los disolventes se filtraron cuidadosamente al vacío filtrando 1000 mL de Agua con membrana FP-450 y 1000 mL de Acetonitrilo con membrana Flouropore, ambas de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro, además de 1000 mL de metanol para realizar lavados; éste último disolvente también se filtró con una membrana igual a la empleada para el acetonitrilo.

El proceso de filtración, se realizó para asegurar la eliminación de partículas en suspensión que pueden perjudicar a los componentes del sistema HPLC. Estas partículas en suspensión pueden provenir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasegado de solvente en el depósito para solvente, la exposición a partículas del aire durante el almacenamiento del solvente en el depósito del solvente, la degradación lenta del recipiente solvente, o de condensación y polimerización del solvente.

Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba HPLC, al guarda columnas, y en general causar desgaste del sistema de HPLC. Los fabricantes de los instrumentos tienen en cuenta este problema y recomiendan que se filtre y desgasifique los solventes HPLC antes de usarlos. (RELAQ.MX)

También se colocaron los reservorios en un sónico para su desgasificación por un periodo de 15 min.

Una vez contando con todos los elementos antes mencionados se procedió a acondicionar el HPLC Altus de la marca Perkin-Elmer, para la realización del desarrollo del método analítico y posteriormente validarlo.

Las condiciones iniciales para el desarrollo fueron:

Equipo HPLC PerkinElmer, Altus.

Detector UV: 254 nm, PerkinElmer. A-15, Altus

Columna: SPHERI-5 RP-18. Tamaño de partícula 5µm.

Dimensiones de la columna: Dimensión de la columna 250 X 4.6 mm

Flujo: 1 mL/min

Volumen de Inyección de 10 µL y

Sistema: Isocrático

Fase móvil: (60:40 ACN:H<sub>2</sub>O).

Detector del equipo: UV

Longitud de onda: 213 nm

Temperatura: Ambiente

Presión: 1000 PSI

Bajo las condiciones mencionadas anteriormente no se obtuvo una buena resolución para observar el analito en estudio por lo cual se ajustaron las condiciones, mismas que se mencionan a continuación.

Equipo HPLC PerkinElmer, Altus.

Detector UV: 254 nm, PerkinElmer. A-15, Altus

Columna: SPHERI-5 RP-18. Tamaño de partícula 5µm.

Dimensión de la columna 250 X 4.6 mm

Sistema: Isocrático

Fase móvil: (80:20 ACN:H<sub>2</sub>O).

Flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 10 µL

Longitud de onda: 213 nm

Temperatura: Ambiente

Presión: 1000 PSI

Bajo estas condiciones se logró una buena resolución y la identificación de un pico en un tiempo de retención de 9.1 minutos. Logrando encontrar el pico correspondiente al analito, con estas condiciones se procedió al desarrollo de los parámetros de validación del método analítico.

## 7.5. Desarrollo de los Parámetros de validación del método analítico HPLC.

Cualquier método analítico que se desarrolle debe validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables. Con relación a los productos farmacéuticos, por hacer la analogía, los métodos codificados en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, se consideran válidos y el único requerimiento es el cumplimiento de la prueba de adecuación indicada en cada monografía. (FEUM, 2018)

Sin embargo, en este caso que corresponde a un método analítico desarrollado por primera vez no es posible guiarse de un método descrito en una monografía de la farmacopea, sino más bien debe adecuarse o apegarse a lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013 para el desarrollo de nuevos fármacos.

Los parámetros estadísticos definidos y requeridos en estos momentos por el laboratorio 325 y para este proyecto son verificación del sistema, linealidad del sistema, linealidad del método, límite de detección y límite de cuantificación, precisión y exactitud, rango y tiempo de retención de MDA. Todos estos parámetros químicos son determinados estadísticamente, las ecuaciones más representativas se encuentran en el **Anexo 1**.

### ***Verificación del sistema***

Columna: SPHERI-5 RP-18, Medida: 5  $\mu$ m, Dimensión: 250 x 4 mm, Número de catálogo: 7120016, Número de serie:36186. Presión: 217 Bar. Lavado de la

columna: Utilizar Fase móvil: Acetonitrilo: Agua (40:60). La **Figura 12** muestra el equipo HPLC empleado.



**Figura 12.** Equipo HPLC.

### **A. Linealidad**

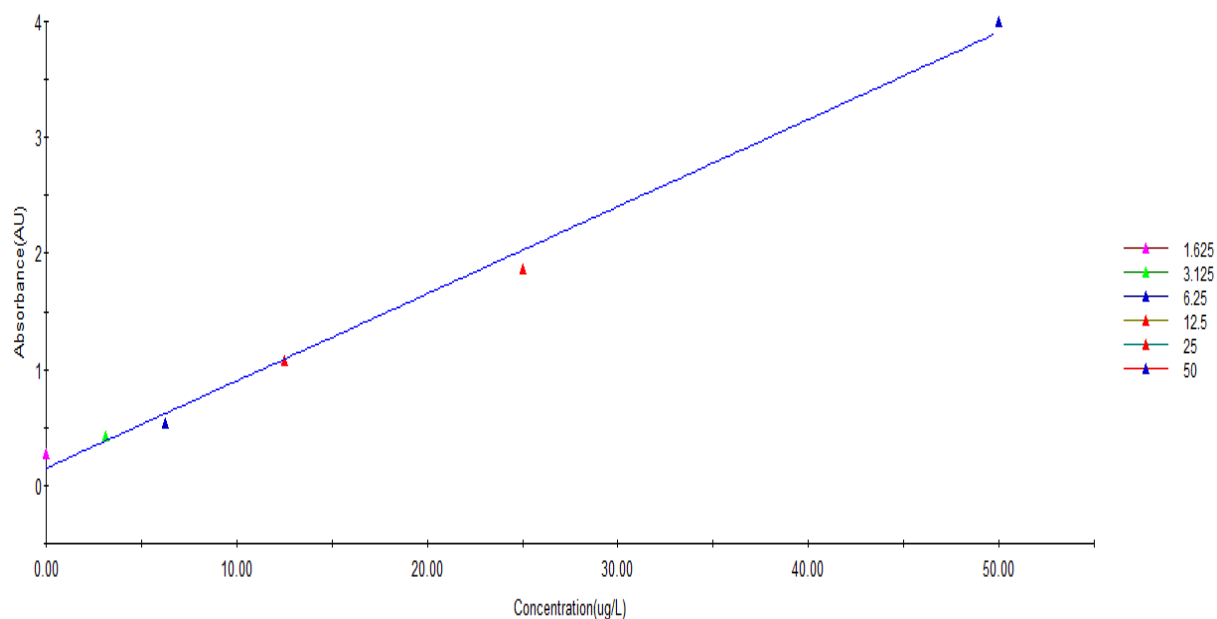
En las **gráficas 1-5** y **tablas 4-8**, se presentan las rectas de calibración efectuadas y las tablas de datos correspondientes para Metil dodonato A, donde se puede determinar de manera visual (cualitativa) la linealidad del sistema. Para verificar dicha linealidad se determinó el coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ), de las 5 rectas realizadas, la **tabla 4** muestra las  $R^2$  de dichas pruebas y en el **Anexo 2**.

Recta	Valor de $R^2$
R1	0.99399
R2	0.97699
R3	0.99739
R4	0.99798
R5	0.99806
<b>Promedio</b>	$0.99288 \pm 0.009$

**Tabla 4.** Valores de  $R^2$  para las rectas empleadas en el proyecto.



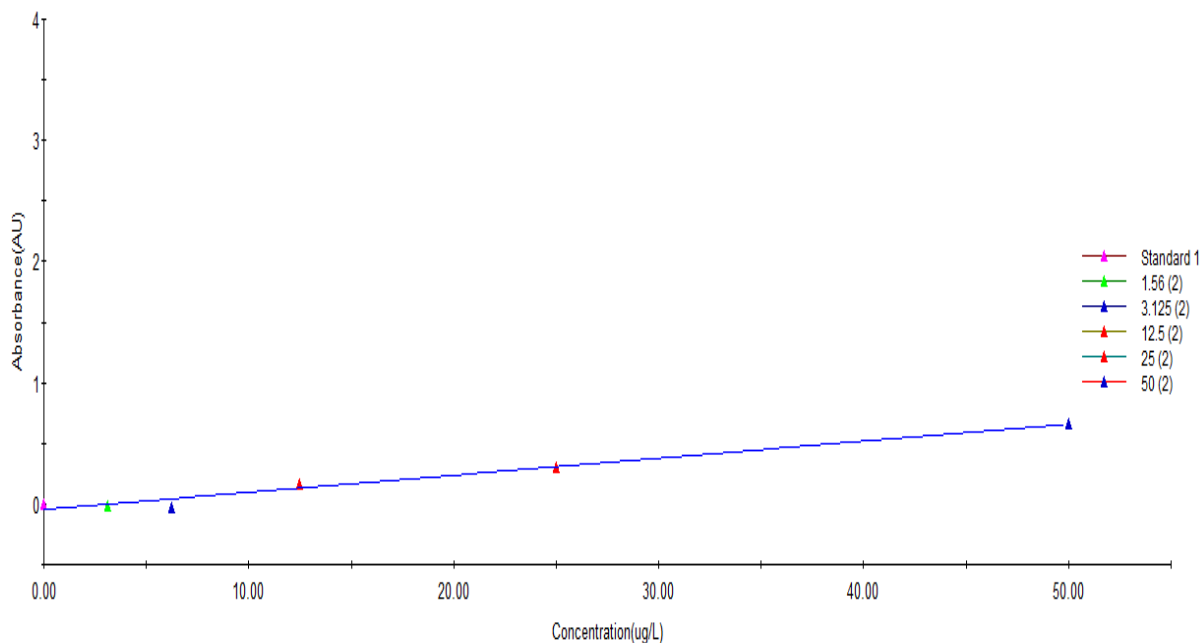
Dada la ecuación de la recta:  $Y = mx + b$  se graficaron los resultados obtenidos a través de las áreas bajo la curva AUC.



**Gráfica 1.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 1er vez.

R <sup>2</sup> : 0.99399 Function: Y = 7.51E-02X + 1.51E-01 Remained Standard Measurement No. : 0			
Name	Type	Concentration(ug/L)	AU(209.00nm)
1.625	Standard	0.00	0.2709
3.125	Standard	3.13	0.4309
6.25	Standard	6.25	0.5358
12.5	Standard	12.50	1.0848
25	Standard	25.00	1.8619
50	Standard	50.00	4

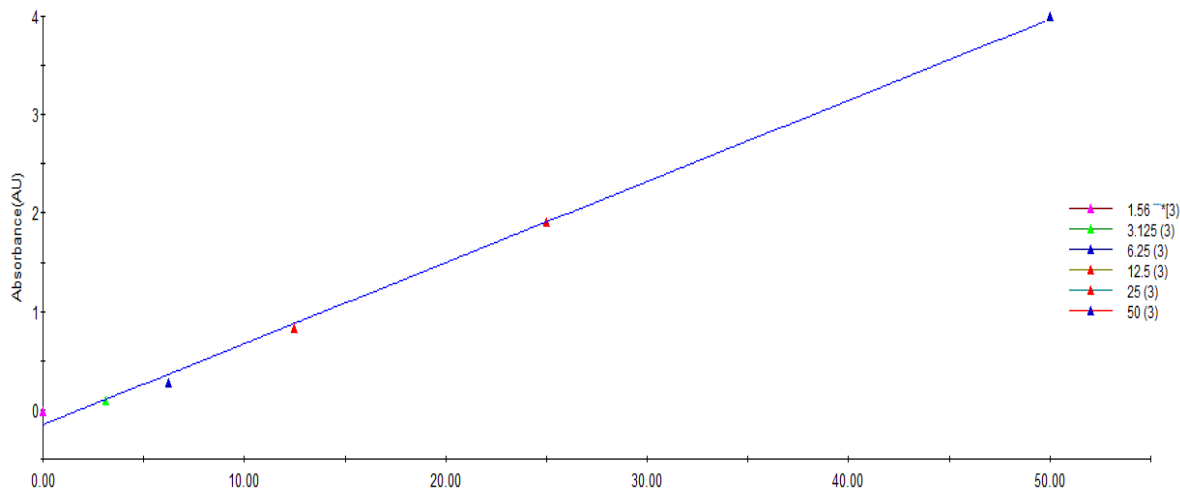
**Tabla 5.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 1 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 1er vez.



**Gráfica 2.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 2da. vez.

R <sup>2</sup> : 0.97699 Function: Y = 1.41E-02X + 4.47E-02 Remained Standard Measurement No. : 0			
Name	Type	Concentration(ug/L)	AU(209.00nm)
Standard 1	Standard	0.00	0.0001
1.56 (2)	Standard	3.13	-0.0132
3.125 (2)	Standard	6.25	-0.025
12.5 (2)	Standard	12.50	0.1689
25 (2)	Standard	25.00	0.3048
50 (2)	Standard	50.00	0.661

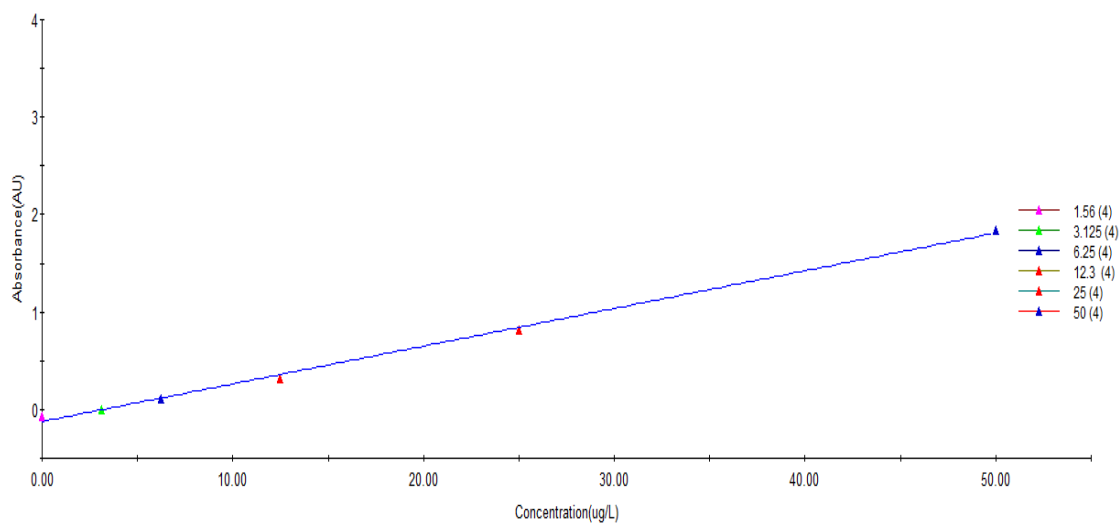
**Tabla 6.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 2 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 2da. vez.



**Gráfica 3.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 3er vez.

R <sup>2</sup> : 0.99739 Function: Y = 8.24E-02X + .151E-01 Remained Standard Measurement No. : 0			
Name	Type	Concentration(ug/L)	AU(209.00nm)
1.56 L+ (3)	Standard	0.00	-0.0137
3.125 (3)	Standard	3.13	0.0943
6.25 (3)	Standard	6.25	0.2731
12.5 (3)	Standard	12.50	0.8232
25 (3)	Standard	25.00	1.9039
50 (3)	Standard	50.00	4

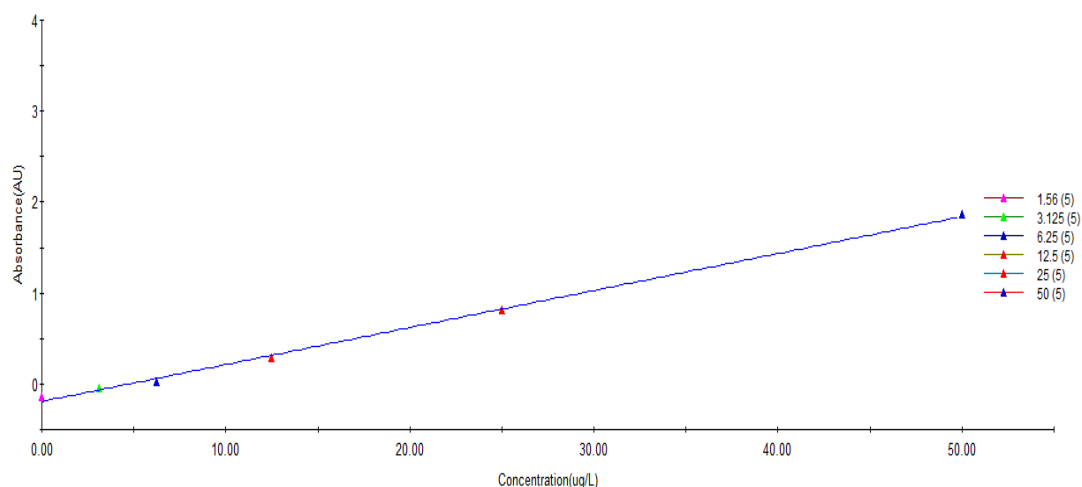
**Tabla 7.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 3 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 3ra vez.



**Gráfica 4.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 4ta vez.

R <sup>2</sup> : 0.99798 Function: Y = 3.87E-02X + -1.23E-01 Remained Standard Measurement No. : 0			
Name	Type	Concentration(ug/L)	AU(209.00nm)
1.56 (4)	Standard	0.00	-0.0764
3.125 (4)	Standard	3.13	0.005
6.25 (4)	Standard	6.25	0.1079
12.3 (4)	Standard	12.50	0.3222
25 (4)	Standard	25.00	0.8144
50 (4)	Standard	50.00	1.8368

**Tabla 8.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 4 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 4ta vez.



**Gráfica 5.** Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 5ta vez.

R<sup>2</sup> : 0.99806 Function: Y = 4.07E-02X + -1.91E-01  
 Remained Standard Measurement No. : 0

Name	Type	Concentration(ug/L)	AU(209.00nm)
1.56 (5)	Standard	0.00	-0.144
3.125 (5)	Standard	3.13	-0.0447
6.25 (5)	Standard	6.25	0.0263
12.5 (5)	Standard	12.50	0.2844
25 (5)	Standard	25.00	0.8087
50 (5)	Standard	50.00	1.8617

**Tabla 9.** Se presentan los valores obtenidos de la Gráfica 5 de la Curva de Calibración de Metil dodonato A, Analizado 5ta vez.

Con los valores obtenidos de los coeficientes de correlación lineal se establece que el sistema es lineal con un intervalo de linealidad promedio de:  $0.99288 \pm 0.009$ ; la mejor recta correspondió a R5, misma que se empleará para

consecutivas pruebas experimentales posteriores. Cuando se desarrolla un método analítico para su aplicación en el desarrollo de un medicamento debe tomarse en cuenta la pureza de la muestra y el valor de  $R^2$  considerando que su aplicación será en tratamientos terapéuticos humanos; por ello el valor de  $R^2$  para el intervalo de linealidad debe ser 0.9999 para lograr procesos estandarizados y validados dentro de la industria farmacéutica al igual que en el desarrollo de patentes. (BESINS HEALTHCARE LUXEMBOURG SARL, 2020)

## B. Límites de Detección y Cuantificación

La definición adoptada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) en 1997 enuncia que “el límite de detección, expresado como una concentración, se deriva de la media más pequeña, que puede ser detectada con una certeza razonable, para un procedimiento analítico dado”.

El uso de un valor de 3 recomendado por la IUPAC, nos da un nivel de confianza del 99.86%. Usando la siguiente formula:

$$C_L = \frac{3 \cdot S_B}{m}$$

Por otra parte, el límite de cuantificación definiéndolo como la concentración de la muestra que da una señal que es 10 veces la desviación estándar del blanco.

Usando la siguiente formula:

$$C_m = \frac{10 \cdot S_B}{m}$$

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación se utilizaron los datos del análisis de linealidad de las rectas de calibración de las tablas 5, 6 y 7, basándose en la concentración y absorbancia, obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla 10** y en el **Anexo 3**.

COMPUESTO	Límite de Detección μg/mL	Límite de Cuantificación μg/mL
Metil dodonato A	7.03	23.45

**Tabla 10.** Se presentan los resultados obtenidos de LD y LC.

Considerando que el límite de detección (LD): Es la menor concentración de la sustancia en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas, para MDA este límite fue de 7.03 μg/mL; de esta manera, la prueba de límite solamente fundamenta que la concentración del analito estará por encima o por debajo de un nivel de seguridad en donde no se confundiría con señales de ruido del equipo.

La Farmacopea sugiere que cuando la determinación del LD se realiza con métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 3:1 ó 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección. (Farmacopea 2018) En éste caso no fue necesario ya que el equipo no mostró señales de ruido.

### C. Precisión y Exactitud

En determinación de la precisión, lo que aplicará para el método en desarrollo es la repetibilidad y reproducibilidad.

En el caso de la Repetibilidad como el estudio se realizó el mismo día, a la misma concentración y con las cinco rectas (R1-R5), siendo el mismo analista, las mismas condiciones cromatográficas y la misma instrumentación, se logra establecer que existe repetibilidad observando los datos obtenidos para el día 1 como muestra la **tabla 11**.

En cuanto a la Reproducibilidad, se considera que si es reproducible dado que no existe diferencia significativa entre los datos del día 1 y del día 3, analizando las mismas muestras a las mismas concentraciones y con las mismas condiciones y por el mismo analista. **Tablas 11 y 12 y Anexo 4**.

Conc. (µg/ml)	R1	R2	R3	R4	R5	Media	STD	RSD (Precision)	EX (Exactitud)
1.56	3,472	1,656	3,945	2,038	1,455	2,513	1,123.5816	44.7072	- 161,002.56
3.125	6,934	3,370	8,921	3,870	2,592	5,137	2,681.0664	52.1872	- 164,296.80
6.25	15,054	7,445	18,976	7,838	5,202	10,903	5,836.4698	53.5309	- 174,348.00
12.5	32,066	12,969	39,638	17,847	10,725	22,649	12,611.9922	55.6845	- 181,092.00
25	69,754	26,707	83,904	36,541	22,649	47,911	27,338.9276	57.0619	- 191,544.00
50	140,091	56,450	172,826	75,570	47,905	98,568	55,018.1415	55.8172	- 197,036.80
100	294,811	140,017	362,327	158,389	100,426	211,194	111,755.3909	52.9160	- 211,094.00

**Tabla 11.** Resultados obtenidos de los cromatogramas analizados el día 1.

Conc. (µg/ml)	R1	R2	R3	R4	R5	Media	STD	RSD (Precision)	EX (Exactitud)
1.56	3,611	1,715	4,147	2,101	1,519	2,619	1,184.7349	45.2431	- 167,758.97
3.125	7,218	3,485	9,204	3,996	2,717	5,324	2,765.1216	51.9369	- 170,268.00
6.25	15,312	7,651	19,927	8,102	5,443	11,287	6,090.3055	53.9586	- 180,492.00
12.5	32,491	13,253	40,690	18,294	11,144	23,174	12,850.8588	55.4528	- 185,295.20
25	70,756	27,394	85,964	37,783	23,608	49,101	27,735.3737	56.4864	- 196,304.00
50	142,316	57,742	179,313	78,972	49,810	101,631	56,601.3538	55.6932	- 203,161.20
100	298,270	144,464	385,097	163,518	105,433	219,356	117,688.8295	53.6519	- 219,256.40

**Tabla 12.** Resultados obtenidos de los cromatogramas analizados el día 3.



La Farmacopea menciona que: La **exactitud** de un método analítico es la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico. En este caso se determinó mediante el cálculo del coeficiente de variabilidad (CV), obtenido entre las determinaciones independientes realizadas en un día por un mismo analista y en el mismo equipo. (Farmacopea, 2018)

Por otra parte, La **precisión** de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. (Farmacopea, 2018)

La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto. La precisión intermedia expresa las variaciones intra laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos).

Bajo estos lineamientos, el método analítico desarrollado es exacto y preciso considerando sus valores de coeficiente de variabilidad, repetibilidad y reproducibilidad.

#### **D. Rango:**

El **rango** es el intervalo comprendido entre la concentración superior e inferior del principio activo evaluado para el cual se ha demostrado precisión, exactitud y linealidad. A continuación se presentan los datos correspondientes para considerar en este parámetro de validación para MDA.

Peso de muestra (CHAP-2): 0.001 g

Volumen: 10  $\mu$ L (Acetonitrilo: Agua, 80:20)

Diluciones: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562  $\mu$ g/mL

El **rango** es de 100-1.562.

El sistema y el método son lineales de acuerdo con el rango de concentraciones de (1.562 a 100  $\mu$ g/mL) de MDA; este argumento se basa en los valores obtenidos de la regresión lineal de orden uno aceptables para cada una de las rectas (R1-R5) con un coeficiente de correlación mayor a (0.992 en promedio) y con convergencia al origen con una confianza del 95.0 %.

#### **E. Tiempo de retención de Metil dodonato A.**

El tiempo de retención de un analito ( $t_r$ ) es el tiempo que tarda en llegar al detector desde que la muestra es introducida en el cromatógrafo. Si se mantienen constantes las condiciones de trabajo es una característica de cada compuesto en un sistema cromatográfico dado. Se deduce por tanto que  $t_r$  puede utilizarse como variable cualitativa, mientras que la altura o el área bajo la curva del pico (AUC) es la variable cuantitativa. (Mauri, A. *et al*, 2010)

Para metil dodonato A siguiendo la estrategia de validación se obtuvieron los valores del tiempo de retención para los días 1 y 3 para el total de las diluciones ensayadas como lo muestran las **Tablas 13 y 14**. En la tabla 13, es posible observar que el promedio del tiempo de retención para las 5 rectas con el total de disoluciones

(100.0 a 1.56 mg/mL) fue de 9.11 minutos; mientras que para la realización del mismo ensayo el día 3 se obtiene un valor promedio de tiempo de retención de 8.894 minutos.

Conc. (µg/ml)	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
1.56	9.092	9.066	9.112	9.129	9.143	9.108
3.125	9.079	9.076	9.109	9.127	9.152	9.109
6.25	9.064	9.085	9.112	9.125	9.154	9.108
12.5	9.064	9.082	9.112	9.114	9.154	9.105
25	9.068	9.086	9.111	9.119	9.157	9.108
50	9.072	9.094	9.114	9.129	9.166	9.115
100	9.057	9.092	9.121	9.139	9.169	9.116
						9.110

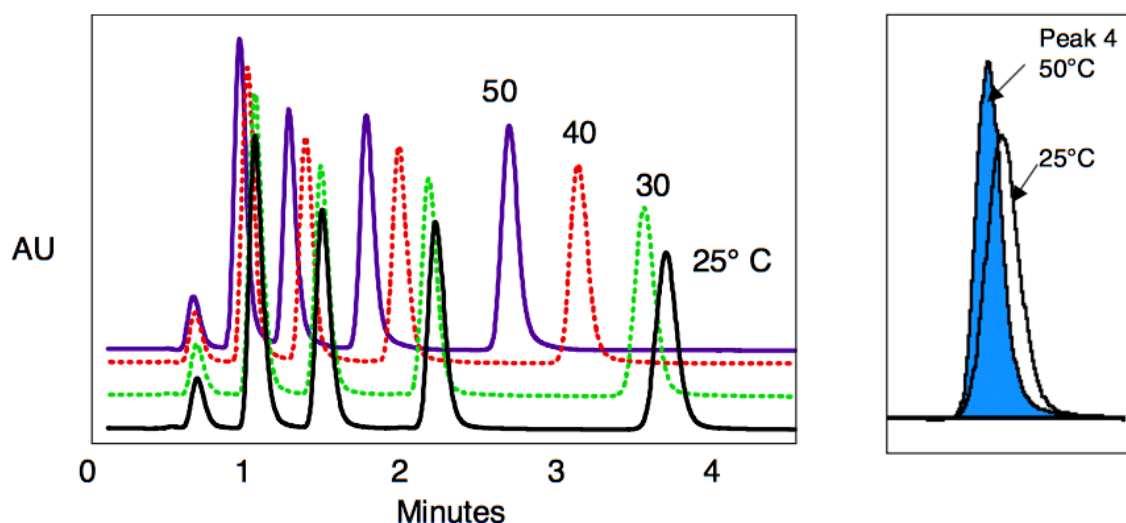
**Tabla 13.** Resultados del tiempo de retención (RT) en minutos del día 1.

Conc. (µg/ml)	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
1.56	8.868	8.867	8.891	8.904	8.935	8.893
3.125	8.854	8.875	8.881	8.906	8.938	8.891
6.25	8.844	8.886	8.886	8.911	8.936	8.893
12.5	8.834	8.886	8.889	8.917	8.941	8.893
25	8.83	8.89	8.891	8.917	8.943	8.894
50	8.833	8.886	8.89	8.919	8.945	8.895
100	8.839	8.886	8.89	8.926	8.943	8.897
						8.894

**Tabla 14.** Resultados del tiempo de retención (RT) en minutos del día 3.

Cabe mencionar que esta variación de 0.216 minutos puede responder a varios factores, entre ellos se encuentra la temperatura ambiental que puede afectar la fluidez de los disolventes de la fase móvil y con ello varia la presión que conduce al decremento del tiempo de retención. (Li, J.B. Waters Corporation, Milford, MA. 1999) como se muestra en la **Figura 13**; en donde, a medida que aumenta la temperatura, se acortan los tiempos de retención máximos. La cromatografía es una serie de reacciones de equilibrio en las que los analitos se disuelven en la fase móvil

o se adsorben en la fase estacionaria de la columna. Cuanto mayor sea la temperatura, más rápido será el intercambio de los analitos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Una separación isocrática simple muestra que una reducción del 30 % en el tiempo de retención es el resultado de elevar la temperatura a 50 °C.



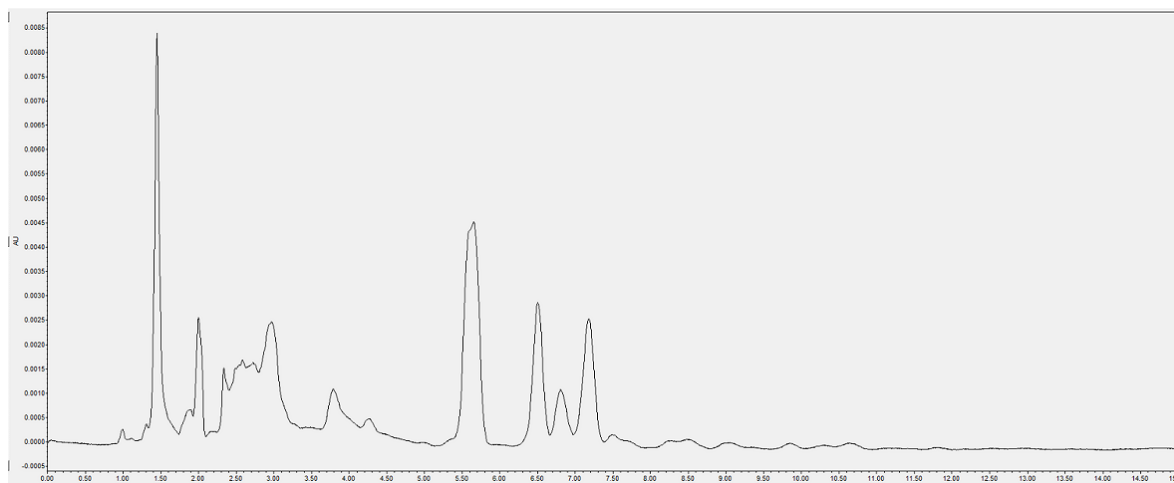
**Figura 13.** Efecto de la temperatura sobre el tiempo de retención y la forma del pico. Separación isocrática de acetona y alquilfenonas C2-C4 en metanol-agua 60:40 en una columna Symmetry<sup>R</sup> C<sub>18</sub> de 2.1 x 30 mm. (Li, J.B. Waters Corporation, Milford, MA. 1999).

Otro factor que puede afectar el tiempo de retención es el tamaño de poro de la fase estacionaria y la influencia del uso de fases móviles acuosas como se demuestra en el caso del estudio sobre varias vitaminas del complejo B. El fenómeno de la pérdida de tiempo de retención inducida por la fase móvil acuosa, se conoce como “comportamiento de colapso de fase”, y se investiga en función del tamaño de poro de la sílice, la química de la fase ligada y la densidad de la fase estacionaria ligada. (Bidleingmeyer, B. A. y Broske, A. D. 2004)

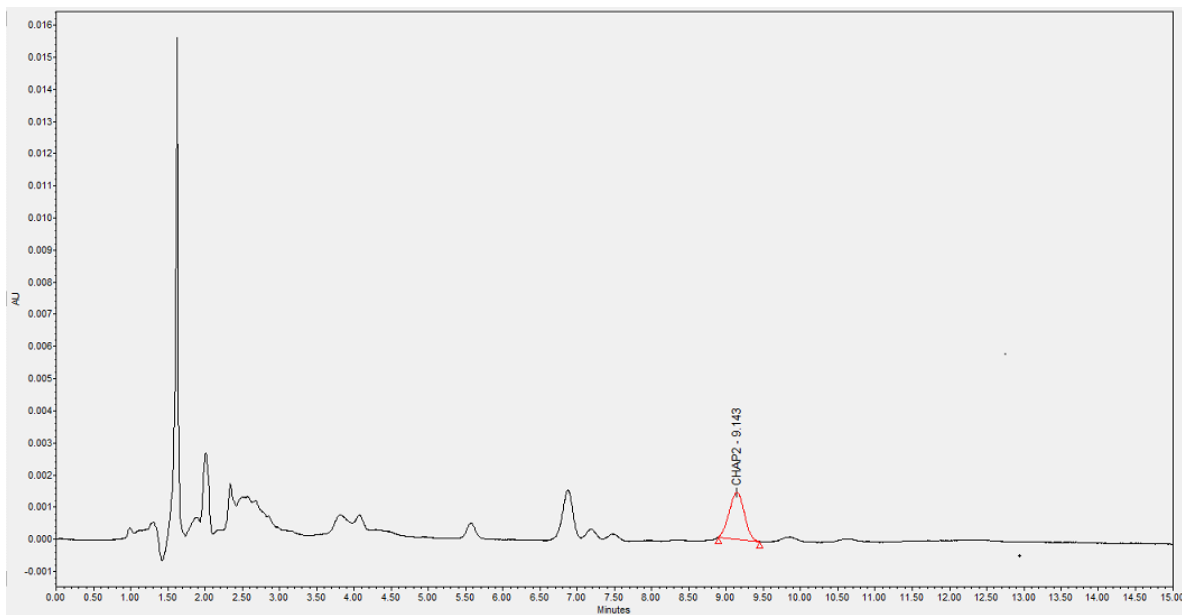
No obstante, la utilidad de  $t_r$  en la identificación de componentes en una muestra es limitada, ya que es posible que distintos compuestos presenten tiempos de retención similares y aparecer parcial o totalmente solapados con el  $t_r$  del analito en cuestión. Para ello, sería necesario realizar modificaciones al método desarrollado.

## 7.6. Cromatogramas experimentales obtenidos

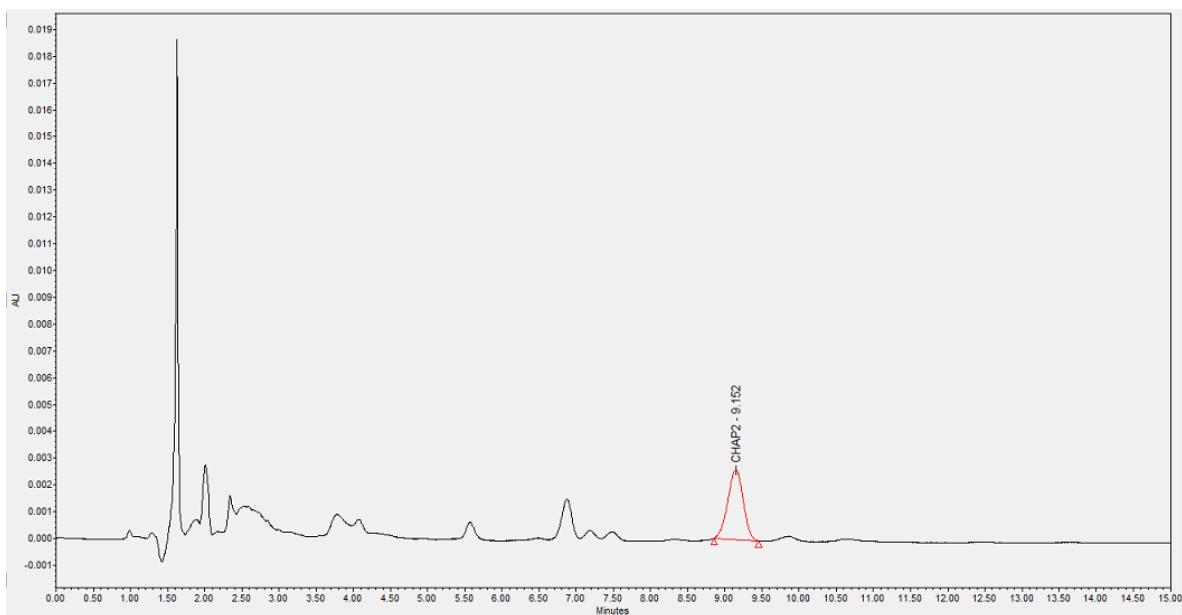
A continuación, en las **figuras 14 – 22**, se presentan los cromatogramas obtenidos en el equipo HPLC Altus Perkin Elmer en base a las condiciones cromatográficas establecidas en el nuevo método analítico desarrollado.



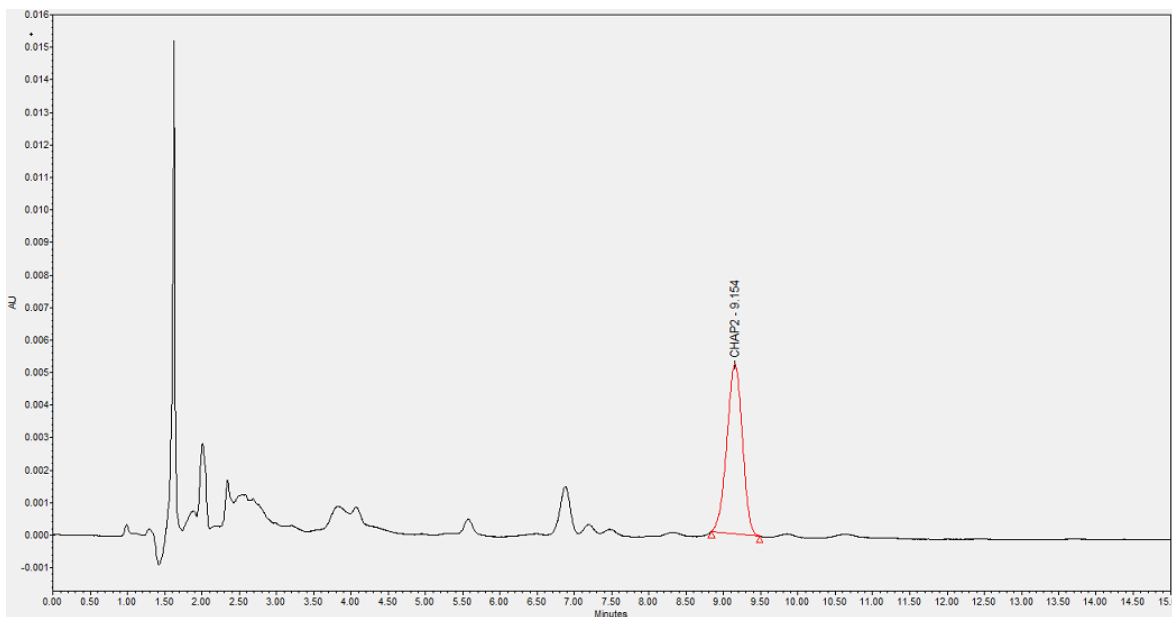
**Figura 14.** Se presenta el resultado de cromatograma (Blanco).



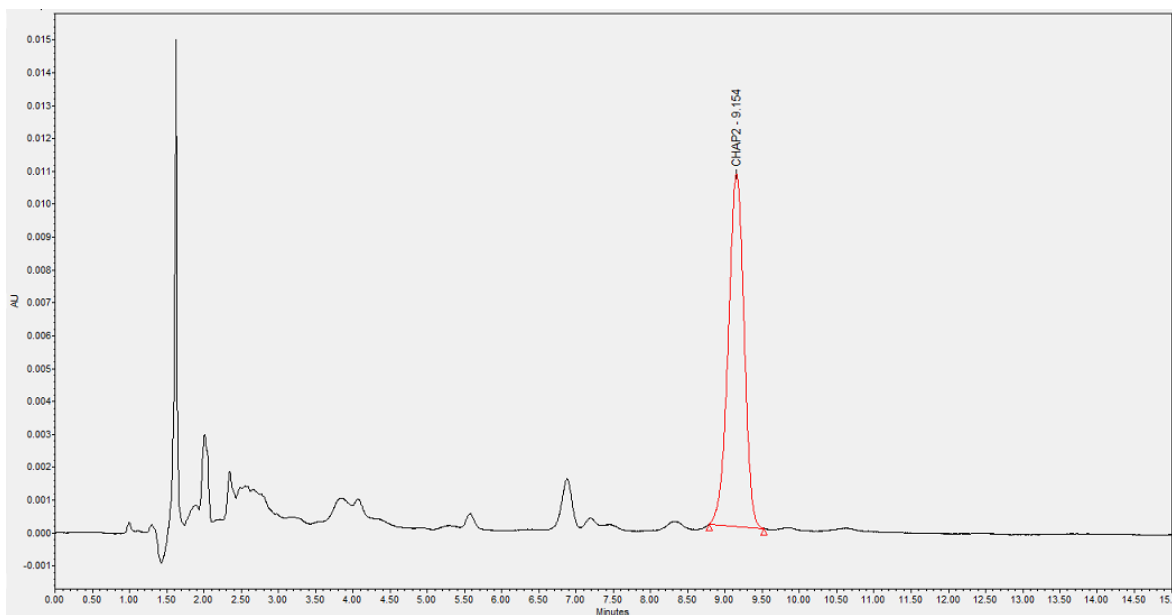
**Figura 15.** Se presenta el cromatograma con concentración de 1.56  $\mu\text{g/mL}$ .



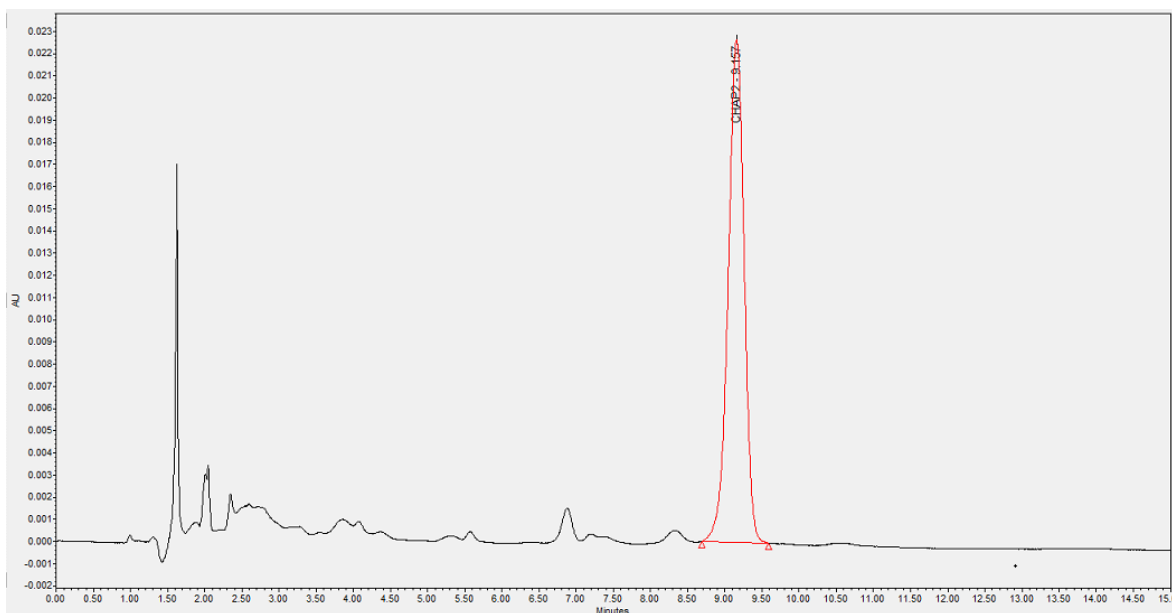
**Figura 16.** Se presenta el Cromatograma con concentración de 3.125  $\mu\text{g/mL}$ .



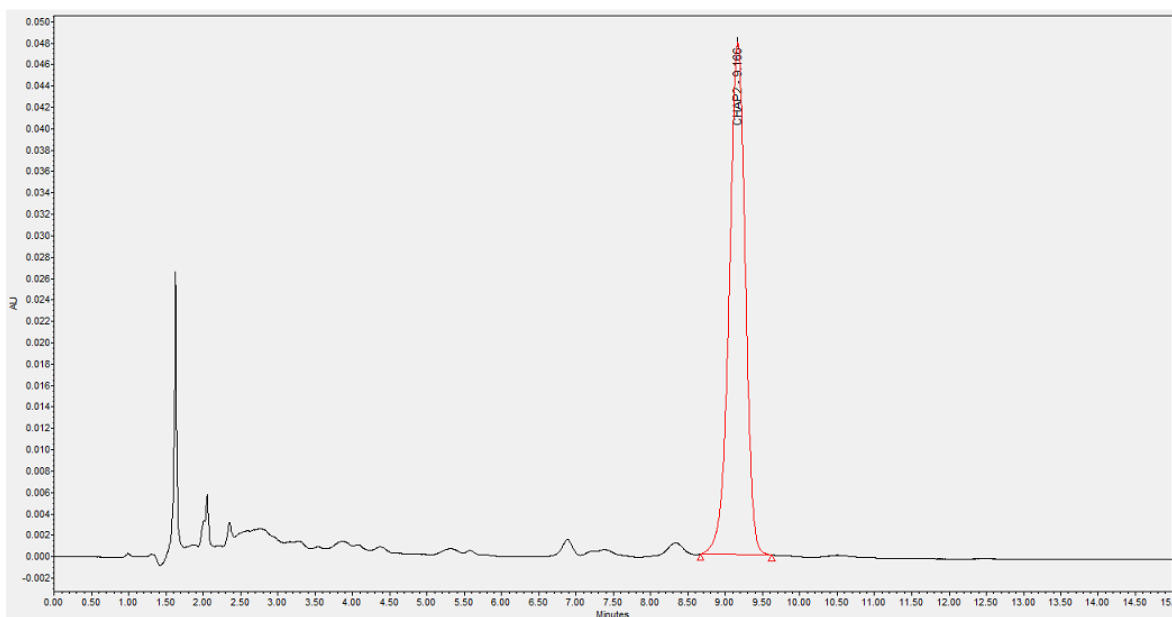
**Figura 17.** Se presenta el Cromatograma con concentración de 6.25  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 18.** Se presenta el cromatograma con concentración de 12.5  $\mu\text{g/mL}$ .

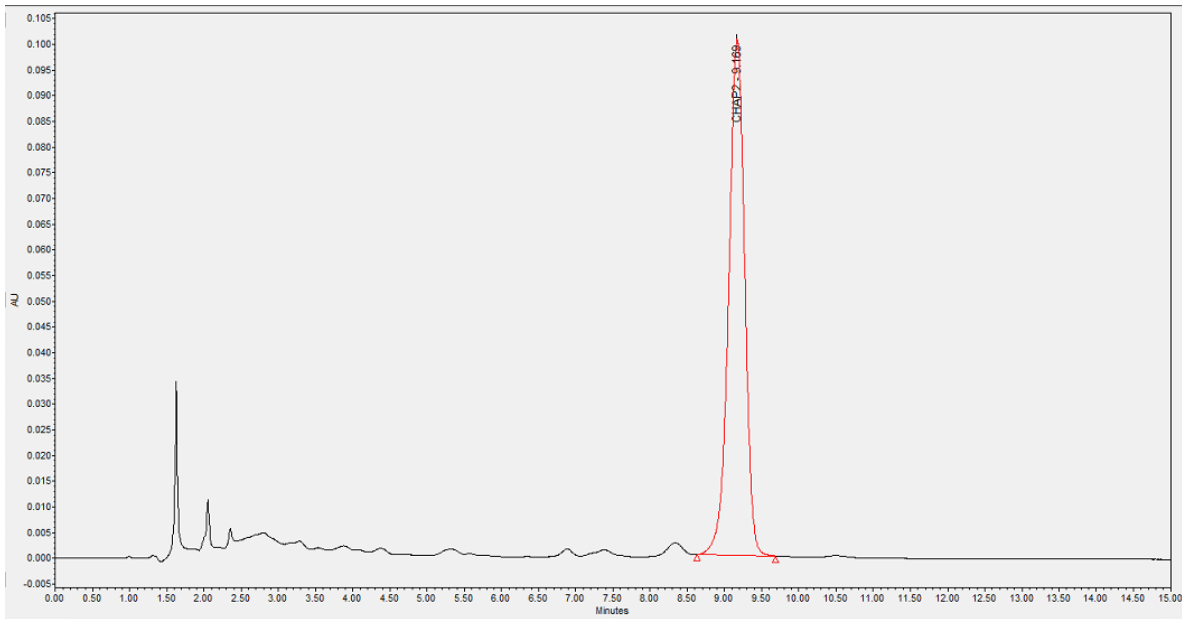


**Figura 19.** Se presenta el cromatograma con concentración de 25 µg/mL.

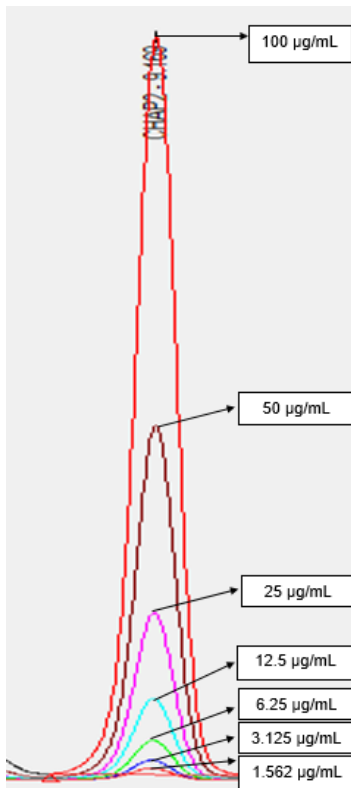


**Figura 20.** se presenta el cromatograma con concentración de 50 µg/mL.





**Figura 21.** Se presenta el cromatograma con concentración de 100 µg/mL.



**Figura 22.** Muestra los cromatogramas conforme va en aumento la concentración, va en aumento el área.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, es posible mencionar que el método desarrollado y validado para el compuesto metil dodonato A se apega a lo dispuesto por la NMX-EC-17025-IMNC-2006; al contar con un método analítico HPLC validado no normalizado, que satisfacen las necesidades propias del laboratorio, quedando constancia de la realización del presente protocolo de desarrollo y validación. Así mismo es posible mencionar que se apega a la NOM-177-SSA1-2013 es su apartado 9 de Criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia.

## 8. CONCLUSIONES

El desarrollo del método analítico propuesto para el Metil dodonato A, en base al diseño experimental para la cuantificación, fue llevado a cabo con éxito, ya que los resultados obtenidos se apegan a los lineamientos de la normativa nacional.

La respuesta a la hipótesis planteada en el presente trabajo se responde expresando que el método analítico propuesto fue desarrollado y validado mediante el análisis estadístico de los resultados de los análisis realizados en el equipo HPLC, mediante el estudio de cada una de las características de desempeño del método como: verificación del sistema, Linealidad, LD, LC, Precisión, Exactitud y Rango.

Con la información obtenida de los resultados de los análisis aplicados a la muestra de Metil dodonato A, se concluye que el método cumple con los parámetros establecidos para los cuales es diseñado y será aplicado para la cuantificación del compuesto en diferentes matrices orgánicas y biológicas según el caso.

## 9. PERSPECTIVAS

- Continuar la investigación en búsqueda de alguna matriz o formulación.
- Retar al equipo analítico a cuantificar el Metil dodonato A.
- Aplicar la misma estrategia de desarrollo y validación en la determinación de otros compuestos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Agilent. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3651ES.pdf> Fecha de consulta mayo 2021

Atanas G. Atanasov, Sergey B. Zotchev, Verena M. Dirsch and Claudiu T. Supuran (2021) Natural products in drug discovery: advances and opportunities [www.nature.com/nrd](http://www.nature.com/nrd) 200 | March 2021 | volume 20.

BESINS HEALTHCARE LUXEMBOURG SARL (Patente) Composiciones farmacéuticas transdérmicas que comprenden un SERM (fecha de concesión europea 2020).

<https://patentimages.storage.googleapis.com/ae/95/de/033273e978b45c/ES2783861T3.pdf>

Bidlingmeyer, B. A. y Broske, A. D. (2004) The Role of Pore Size and Stationary Phase Composition in Preventing Aqueous-Induced Retention Time Loss in Reversed-Phase HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 42, 100-106.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS 2022) <https://www.gob.mx/cofepris/documentos/documentos-informativos-de-medicamentos>

Córdova Ocampo, D. (2022) Identificación y cuantificación de Metil dodonato A en cultivos de callos y plantas jóvenes de *Dodonaea viscosa* L. Jacq. Tesis de Maestría en Biotecnología, UAEM.

Domínguez-Villegas, V., Andrade-Carrera, B., Maldonado, E., Ortega, A. y Garduño-Ramírez, M. L. (2017) Determinación de la actividad antiinflamatoria in vivo de diterpenos naturales y derivados de la especie vegetal *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. *Rev. Latinoamer. Quím.* 45, supl. esp. 283.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, duodécima edición. (2018) Apéndice III.

Faulkner, B. 2021

[https://www.ehowenespanol.com/importancia-hplc-medicamentos-farmacias-sobre\\_154094/](https://www.ehowenespanol.com/importancia-hplc-medicamentos-farmacias-sobre_154094/)

Fecha de consulta : Julio 2021

Guía de validación de métodos analíticos edición 2019 CNQFB

Guía de validación de métodos analíticos edición 2002 CNQFB

Harris, D. C. (2001) Análisis Químico Cuantitativo 2ª. Edición Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España.

ISO: 9000:2005

[http://www.umc.edu.ve/pdf/calidad/normasISO/Norma\\_ISO\\_9000\\_2005.pdf](http://www.umc.edu.ve/pdf/calidad/normasISO/Norma_ISO_9000_2005.pdf) Fecha de consulta febrero 2022

Juan-Pérez, J. I.; Jesús Gastón Gutiérrez-Cedillo, Xanat Antonio Némiga, Miguel Ángel Balderas-Plata y José Francisco Ramírez-Dávila (2010) Multifuncionalidad y manejo campesino del Chapulixtle (*Dodonae viscosa*) en una región cálida del Estado de México Agric. Soc. Desarro vol.7 no.1 Texcoco ene./abr. 2010.

Li, J.B. Waters Corporation, Milford, MA. 1999.  
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/watersamd30.pdf>

Loro, J. F., 2001)–“Manual de cromatografía”. Colección Textos Universitarios. 2001

LTIUVa, 2022 Laboratorio de Técnicas Instrumentales Uva  
<https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-liquidos-hplc> Fecha de consulta enero 2022

Lucena, P., Domínguez-Villegas, V., Andrade-Carrera, B., Clares, B., Calpena, A. y Garduño-Ramírez, M. L. (2018) Desarrollo de formulaciones nanoestructuradas y su análisis morfométrico para dodonatos naturales y derivados *Rev. Latinoamer. Quím.* 46, supl. esp. 176.

Martínez, M., 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Mauri, A., Llobat, M. y Herráez, R. (2010) Laboratorio de Análisis Instrumental. Publicaciones de la Universitat de València. Primera Edición ISBN: 978-84-370-8758-0.

Newman, D. J. and Cragg, G.M. (2020) Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019 *Journal of Natural Products* 83 (3), 770-803.

NMX-EC-17025-IMNC-2006

<http://integra.cimav.edu.mx/intranet/data/files/calidad/documentos/externos/NMX-EC-17025-IMNC-2006.pdf> Fecha de consulta: Junio 2021

NOM-177-SSA1-2013

[http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0) Fecha de consulta: Junio 2021

OMS, 2002, Anexo 3 Buenas prácticas para laboratorios nacionales de control farmacéutico

[https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/Informe\\_36\\_Anexo\\_3.pdf](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/Informe_36_Anexo_3.pdf)

Ortega, A., García, P. E., Cárdenas, J., Mancera, C., Marquina, S., Garduño M. L. y Maldonado, E. (2001) Methyl dodonates, a new type of diterpenes with a modified clerodane skeleton from *Dodonaea viscosa* *Tetrahedron*, 57, 2981-2989.

Química.es

[https://www.quimica.es/enciclopedia/Cromatograf%C3%ADa\\_I%C3%ADquida.html](https://www.quimica.es/enciclopedia/Cromatograf%C3%ADa_I%C3%ADquida.html)

Fecha de consulta: mayo 2021

Red Latinoamericana de Química (RELAQ.MX)

<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm> Fecha de consulta: junio 2021.

Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Soledad Rodríguez Beatriz Elena (2009) La validación en la industria. ISBN: 0557070562

Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G., Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica, 1998, México, D.F.



## 11. ANEXOS

### **Anexo 1:Ffórmulas generales de cálculo**

Media

$$Y = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{Y} \times 100$$

*LD*

$$C_L = \frac{3 \cdot S_B}{m}$$

*LC*

$$C_m = \frac{10 \cdot S_B}{m}$$

**Anexo 2: Procedimiento de cálculo y gráficas de cada recta obtenida en el cromatograma de HPLC para la obtención de los coeficientes de variación.**

**Día 1**

**Recta 1**

Concentración del analito (µg/mL)	AUC	Area <sup>2</sup>
1.56	3472	12054784
3.125	6934	48080356
6.25	15054	226622916
12.5	32066	1028228356
25	69754	4865620516
50	140091	1.9625X10 <sup>10</sup>
100	294811	8.6913X10 <sup>10</sup>
SUMATORIA DE AREAS	562182	1.1271X10 <sup>11</sup>

Media

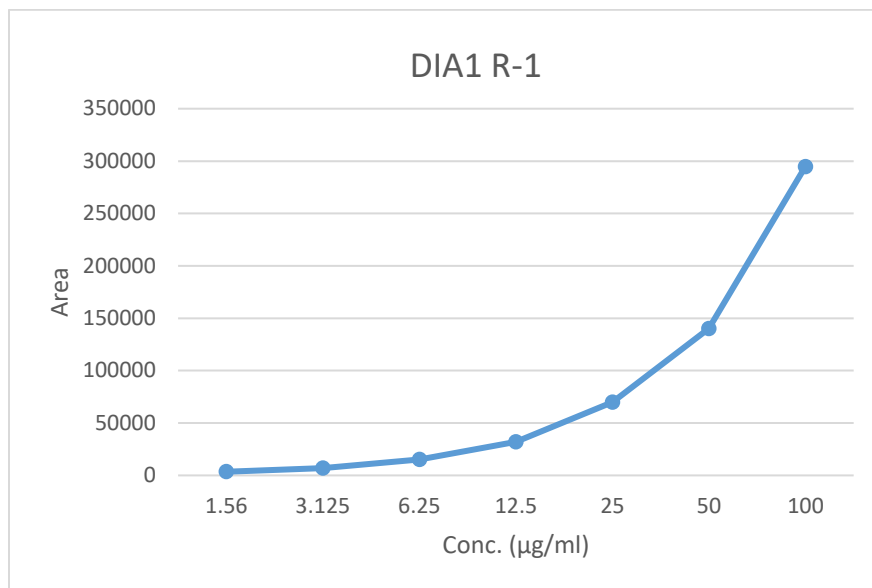
$$Y = \frac{562182}{7} = 80311.7142$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(1.1271 \times 10^{11}) - 562182^2}{7(7 - 1)}} = 106113.3041$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{106113.3041}{80311.7142} \times 100 = 132.1268$$



### Recta 2

Concentración del analito (µg/mL)	Área	Area <sup>2</sup>
1.56	1656	2742336
3.125	3370	11356900
6.25	7445	55428025
12.5	12969	168194961
25	26707	713263849
50	56450	3186602500
100	140017	1.9604X10 <sup>11</sup>
SUMATORIA DE AREAS	248614	2.3741X10 <sup>11</sup>

Media

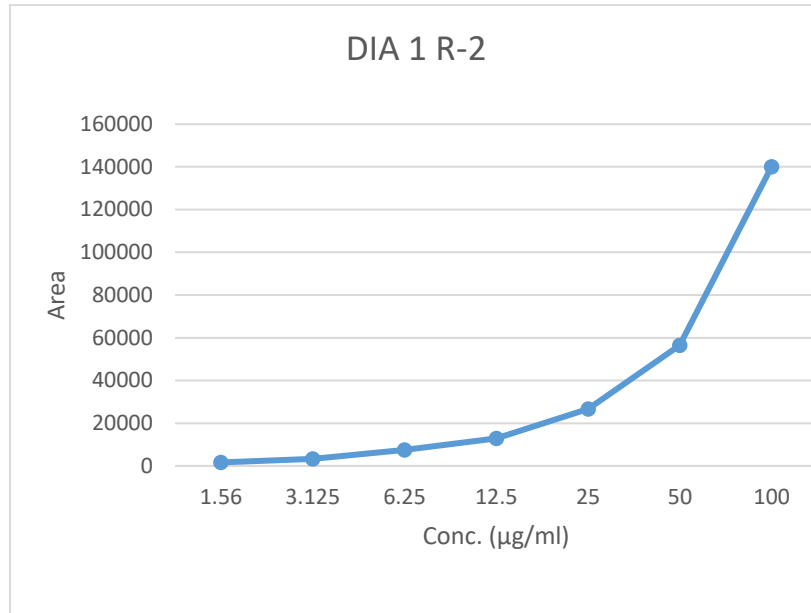
$$Y = \frac{248614}{7} = 35516.2857$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(2.3741 \times 10^{11}) - 248614^2}{7(7 - 1)}} = 49851.7036$$

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{49851.7036}{35516.2857} \times 100 = 140.3629$$



**Recta 3**

Concentración del analito (µg/mL)	Área	Area <sup>2</sup>
1.56	3945	15563025
3.125	8921	79584241
6.125	18976	360088576
12.5	39638	1571171044
25	83904	7039881216
50	172826	2.9868X10 <sup>10</sup>
100	362327	1.3128X10 <sup>11</sup>
SUMATORIA DE AREAS	690537	1.7021X10 <sup>11</sup>

Media

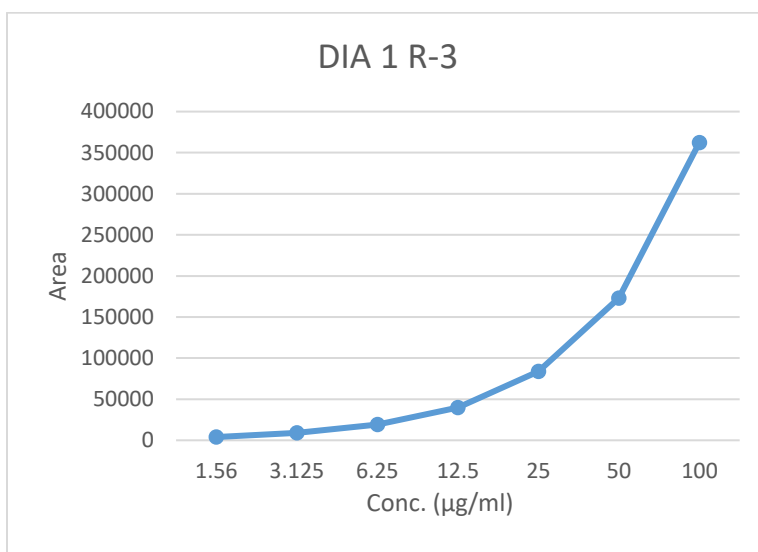
$$Y = \frac{690537}{7} = 98648.1428$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(1.7021 \times 10^{11}) - 690537^2}{7(7 - 1)}} = 130441.4347$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{130441.4347}{98648.1428} \times 100 = 132.2289$$



**Recta 4**

Concentración del analito (µg/mL)	Área	Area <sup>2</sup>
1.56	2038	4153444
3.125	3870	14976900
6.25	7838	61434244
12.5	17847	318515409
25	36541	1335244681
50	75570	5710824900
100	158389	2.5087X10 <sup>10</sup>
SUMATORIA DE AREAS	302093	3.2532X10 <sup>10</sup>

Media

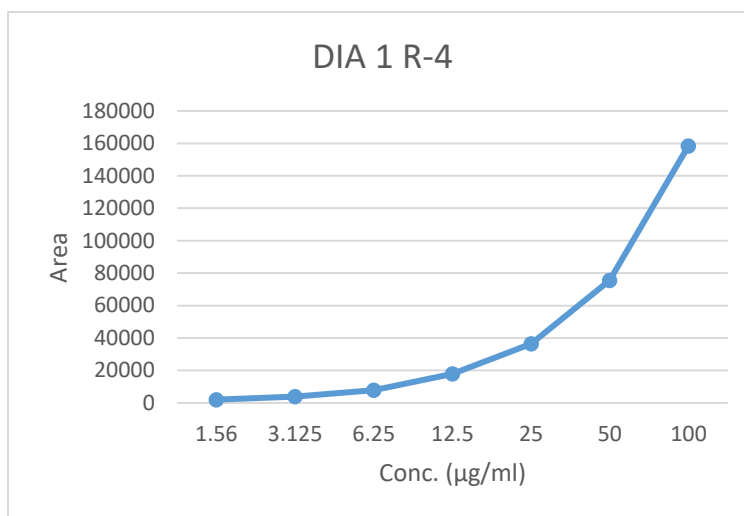
$$Y = \frac{302093}{7} = 43156.1428$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(3.2532 \times 10^{10}) - 302093^2}{7(7 - 1)}} = 57001.2153$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{57001.2153}{43156.1428} \times 100 = 132.0813$$



Recta 5

Concentración del analito (µg/mL)	Área	Area <sup>2</sup>
1.56	1455	2117025
3.125	2592	6718464
6.25	5202	27060804
12.5	10725	115025625
25	22649	512977201
50	47906	2294984836
100	100426	1.0085X10 <sup>10</sup>
SUMATORIA DE AREAS	190955	1.3043X10 <sup>10</sup>

Media

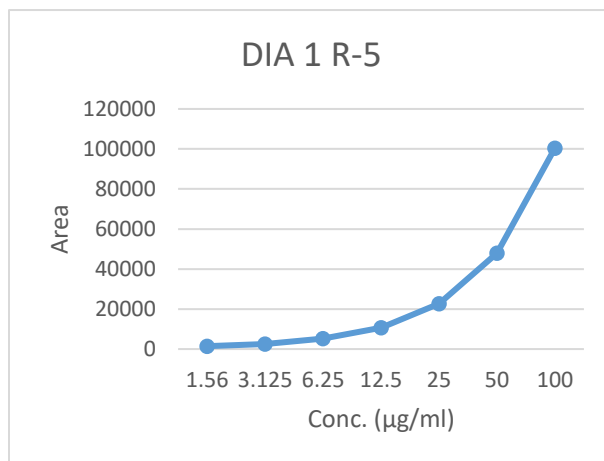
$$Y = \frac{190955}{7} = 27279.2857$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(1.3043 \times 10^{10}) - 190955^2}{7(7 - 1)}} = 36133.7423$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{36133.7423}{27279.2857} \times 100 = 132.4585$$



**Dia 3**

**Recta 1**

Concentración del analito (µg/mL)	AUC	Area <sup>2</sup>
1.56	3611	13039321
3.125	7218	52099524
6.25	15312	234457344
12.5	32491	1055665081
25	70756	5006411536
50	142316	2.0253 × 10 <sup>10</sup>
100	298270	8.8964 × 10 <sup>10</sup>
SUMATORIA DE AREAS	569974	1.1536 × 10 <sup>11</sup>

Media

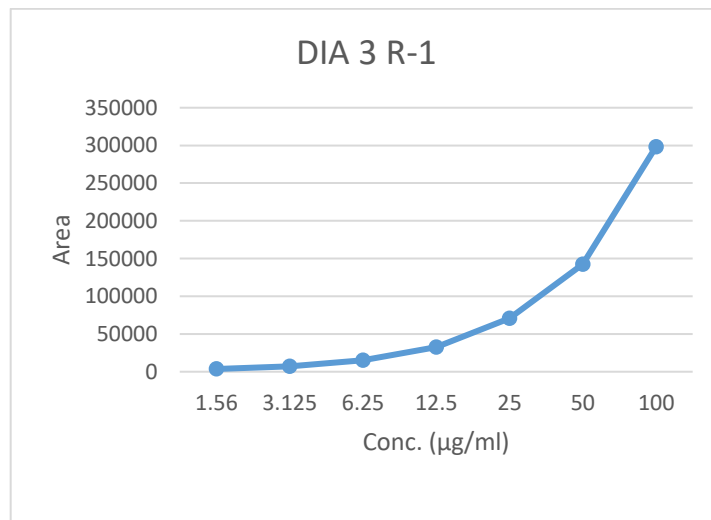
$$Y = \frac{569974}{7} = 81424.8571$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(1.1536 \times 10^{11}) - 569974^2}{7(7 - 1)}} = 107199.1515$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{107199.1515}{81424.8571} \times 100 = 131.6540$$



Recta 2

Concentración del analito (µg/mL)	AUC	Area <sup>2</sup>
1.56	1715	2941225
3.12	3485	12145225
6.25	7651	58537801
12.5	13253	175642009
25	27394	750431236
50	57742	3334138564
100	144464	2.0869X10 <sup>10</sup>
SUMATORIA DE AREAS	255704	2.5202X10 <sup>10</sup>



Media

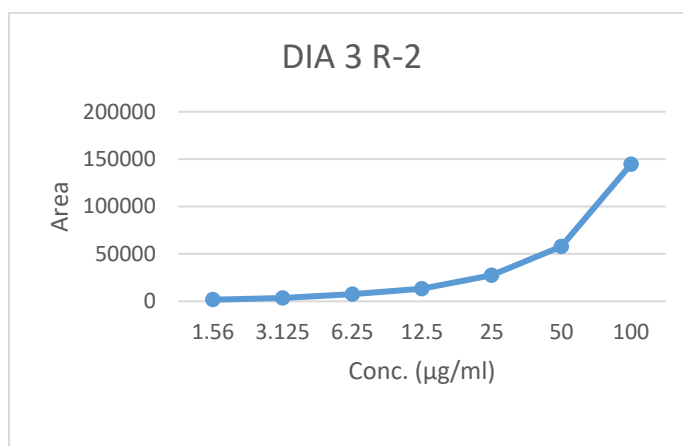
$$Y = \frac{255704}{7} = 36529.1428$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(2.5202 \times 10^{10}) - 255704^2}{7(7 - 1)}} = 51415.5489$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{51415.5489}{36529.1428} \times 100 = 140.7521$$



Recta 3

Concentración del analito (µg/mL)	AUC	Area <sup>2</sup>
1.56	4147	17197609
3.12	9204	84713616
6.25	19927	397085329
12.5	40690	1655676100
25	85964	7389809296
50	179313	3.2153X10 <sup>10</sup>
100	385097	1.4829X10 <sup>11</sup>
SUMATORIA DE AREAS	724342	1.8998X10 <sup>11</sup>

Media

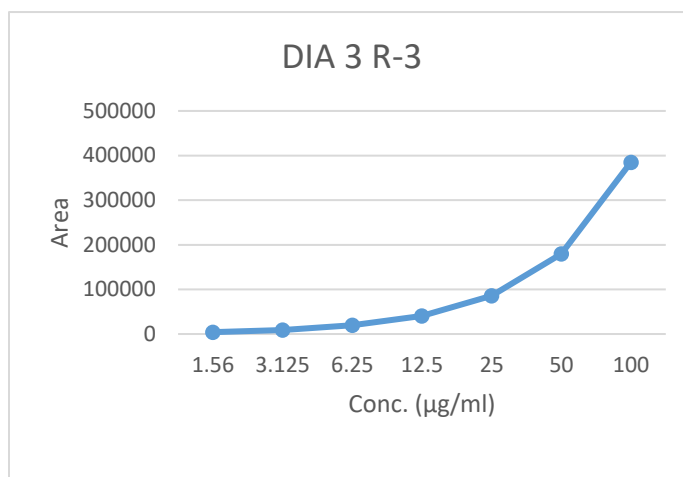
$$Y = \frac{724342}{7} = 103477.4286$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(1.8998 \times 10^{11}) - 724342^2}{7(7 - 1)}} = 138459.9536$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{138459.9536}{103477.4286} \times 100 = 133.8069$$



Recta 4

Concentración del analito (µg/mL)	Área	Area <sup>2</sup>
1.56	2101	4414201
3.12	3996	15968016
6.25	8102	65642404
12.5	18294	334670436
25	37783	1427555089
50	78972	6236576784
100	163518	2.6738X10 <sup>10</sup>
<b>SUMATORIA DE AREAS</b>	<b>312766</b>	<b>3.4822X10<sup>10</sup></b>

Media

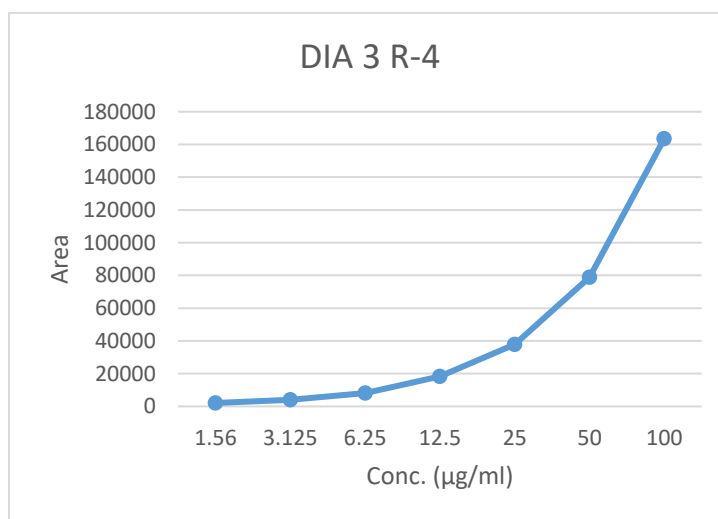
$$Y = \frac{312766}{7} = 44680.8571$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(3.4822 \times 10^{10}) - 312766^2}{7(7 - 1)}} = 58945.3801$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{58945.3801}{44680.8571} \times 100 = 131.9253$$



### Recta 5

Concentración del analito (µg/mL)	Área	Area <sup>2</sup>
1.56	1519	2307361
3.12	2717	7382089
6.25	5443	29626249
12.5	11144	124188736
25	23608	557337664
50	49810	2481036100
100	105433	1.1116X10 <sup>10</sup>
SUMATORIA DE AREAS	199674	1.4317X10 <sup>10</sup>

Media

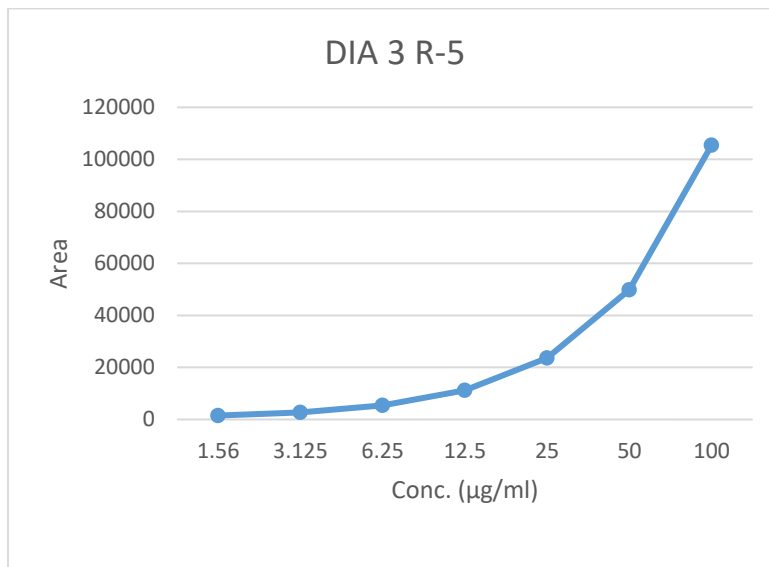
$$Y = \frac{199674}{7} = 28524.8571$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{7(1.4317 \times 10^{10}) - 199674^2}{7(7 - 1)}} = 37906.3048$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{37906.3048}{28524.8571} \times 100 = 132.8886$$



**Anexo 2: Cálculos de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).**

	Curva de calibracion 1	
	concentracion	Absorvancia
	1.56	0.2709
	3.12	0.4309
	6.25	0.5358
	12.5	1.0848
	25	1.8619
	50	4
Pendiente b	0.076239768	
Intercepto a	0.113336609	

	Curva de Calibracion 2	
	Concentracion	Absorvancia
	1.56	0.0001
	3.12	-0.0132
	6.25	-0.025
	12.5	0.1689
	25	0.3048
	50	0.661
Pendiente b	0.014317825	
Intercepto a	-0.052117258	

	Curva de Calibracion 3	
	Concentracion	Absorvancia
	1.56	-0.0137
	3.12	0.0943
	6.25	0.2731
	12.5	0.8232
	25	1.9039
	50	4
Pendiente b	0.083660508	
Intercepto a	-0.192317294	

Promedio de pendientes	0.0580727
Promedio de intercepto	-0.043699314

Concentracion	Absorvancia			Absorvancia Media (Promedio)	Desviacion Estandar
1.56	0.2709	0.0001	-0.0137	0.085766667	0.160478576
3.12	0.4309	-0.0132	0.0943	0.170666667	0.23168967
6.25	0.5358	-0.025	0.2731	0.2613	0.280586154

Absorvancia	Pendiente b	0.036210949
	Intercepto a	0.04064922

Desviacion Estandar	Pendiente b	0.024175344
	Intercepto a	0.136172629

$$Y = 0.03621095 X + 0.04064922$$

Señal de blanco ( $X = 0$ ): 0.04064922

$$Y = 0.02417534 X + 0.13617263$$

Desviación de blanco ( $X = 0$ ): 0.13617263

Límite de Detección

$$C_L = \frac{3 \cdot S_B}{m} = \frac{3 \cdot 0.13617263}{0.058727} = 7.034594396$$

Límite de Cuantificación

$$C_m = \frac{10 \cdot S_B}{m} = \frac{3 \cdot 0.13617263}{0.058727} = 23.44864799$$

Límite de Detección ( $\mu\text{g/mL}$ )	Límite de Cuantificación ( $\mu\text{g/mL}$ )
7.034594396	23.44864799

**Anexo 4: Procedimiento de cálculo para la precisión y exactitud aplicando repetibilidad y reproducibilidad.**

**Día 1**

Concentración del analito 1.56 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	3472	12054784
R2	1656	2742334
R3	3945	15563025
R4	2038	4153444
R5	1455	2117025
SUMATORIA DE AREAS	12566	36630614

Media

$$Y = \frac{12566}{5} = 2513.2$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(36630614) - 12566^2}{5(5 - 1)}} = 1123.5816$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{1123.5816}{2513.2} \times 100 = 44.7047$$

Concentración del analito 3.125 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	6934	48080356
R2	3370	11356900
R3	8921	79584241
R4	3870	14976900
R5	2592	6718464
SUMATORIA DE AREAS	25687	160716861

Media

$$Y = \frac{25687}{5} = 5137.4$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(160716861) - 25687^2}{5(5 - 1)}} = 2681.0663$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{2681.0663}{5137.4} \times 100 = 52.1872$$

Concentración del analito 6.25 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	15054	226622916
R2	7445	55428025
R3	18976	360088576
R4	7838	61434244
R5	5202	27060804
SUMATORIA DE AREAS	54515	730634565

Media

$$Y = \frac{54515}{5} = 10903$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(730634565) - 54515^2}{5(5 - 1)}} = 5836.4698$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{5836.4698}{10903} \times 100 = 53.5308$$



Concentración del analito 12.5 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	32066	1028228356
R2	12969	168194961
R3	39638	1571171044
R4	17847	318515409
R5	10725	115025625
SUMATORIA DE AREAS	113245	3201135395

Media

$$Y = \frac{113245}{5} = 22649$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(3201135395) - 113245^2}{5(5 - 1)}} = 12611.9922$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{12611.9922}{22649} \times 100 = 55.6845$$

Concentración del analito 25 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	69754	4865620516
R2	26707	713263849
R3	83904	7039881216
R4	36541	1335244681
R5	22649	512977201
SUMATORIA DE AREAS	239555	1.4466X10 <sup>10</sup>

Media

$$Y = \frac{562182}{5} = 47911$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(1.4466 \times 10^{10}) - 239555^2}{5(5 - 1)}} = 27334.4123$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{27334.4123}{47911} \times 100 = 57.0524$$

Concentración del analito 50 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	140091	1.9625X10 <sup>10</sup>
R2	56450	3186602500
R3	172826	2.9868X10 <sup>10</sup>
R4	75570	5710824900
R5	47905	2294889025
SUMATORIA DE AREAS	492842	6.0685X10 <sup>10</sup>

Media

$$Y = \frac{492842}{5} = 98568.4$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(6.0685 \times 10^{10}) - 492842^2}{5(5 - 1)}} = 55014.4358$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{55014.4358}{98568.4} \times 100 = 55.8134$$

Concentración del analito 100 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	294811	8.6913X10 <sup>10</sup>
R2	140017	1.9604X10 <sup>10</sup>
R3	362327	1.3128X10 <sup>10</sup>
R4	158389	2.5087X10 <sup>10</sup>
R5	100426	1.0085X10 <sup>10</sup>
SUMATORIA DE AREAS	1055970	1.5481X10 <sup>11</sup>

Media

$$Y = \frac{1055970}{5} = 211194$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(1.5481 \times 10^{11}) - 211194^2}{5(5 - 1)}} = 111,755.3909$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{55014.4358}{98568.4} \times 100 = 52.9160$$

**Dia 3**

Concentración del analito 1.56 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	3611	13039321
R2	1715	2941225
R3	4147	17197609
R4	2101	4414201
R5	1519	2307361
SUMATORIA DE AREAS	13093	39899717

Media

$$Y = \frac{13093}{5} = 2618.6$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(39899717) - 13093^2}{5(5 - 1)}} = 1184.7349$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{1184.7349}{2618.6} \times 100 = 45.2430$$

Concentración del analito 3.12 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	7218	52099524
R2	3485	12145225
R3	9204	84713616
R4	3996	15968016
R5	2717	7382089
SUMATORIA DE AREAS	26620	172308470

Media

$$Y = \frac{26620}{5} = 5324$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(172308470) - 26620^2}{5(5 - 1)}} = 2765.1216$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{2765.1216}{5324} \times 100 = 51.9369$$

Concentración del analito 6.25 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	15312	234457344
R2	7651	58537801
R3	19927	397085320
R4	8102	65642404
R5	5443	29626249
SUMATORIA DE AREAS	56435	785349127

Media

$$Y = \frac{56435}{5} = 11287$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(785349127) - 56435^2}{5(5 - 1)}} = 6090.3054$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{6090.3054}{11287} \times 100 = 53.9585$$

Concentración del analito 12.5 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	32491	1055665081
R2	13253	175642009
R3	40690	1655676100
R4	18294	334670436
R5	11144	124188736
SUMATORIA DE AREAS	115872	3345842362

Media

$$Y = \frac{115872}{5} = 23174.4$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(3345842362) - 115872^2}{5(5 - 1)}} = 12850.8587$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{12850.8587}{23174.4} \times 100 = 55.4528$$

Concentración del analito 25 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	70756	5006411536
R2	27394	750431236
R3	85964	7389809296
R4	37783	1427555089
R5	23608	557337664
SUMATORIA DE AREAS	245505	1.5131X10 <sup>10</sup>

Media

$$Y = \frac{245505}{5} = 49101$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(1.5131 \times 10^{10}) - 245505^2}{5(5 - 1)}} = 27732.9181$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{27732.9181}{49101} \times 100 = 56.4813$$

Concentración del analito 50 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	142316	2.0253X10 <sup>10</sup>
R2	57742	3334138564
R3	179313	3.2153X10 <sup>10</sup>
R4	78972	6236576784
R5	49810	2481036100
SUMATORIA DE AREAS	508153	6.4457X10 <sup>10</sup>

Media

$$Y = \frac{508153}{5} = 101630.6$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(6.4457 \times 10^{10}) - 508153^2}{5(5 - 1)}} = 56597.4949$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{56597.4949}{101630.6} \times 100 = 55.6894$$

Concentración del analito 100 µg/mL.

Corridas (R)	AUC	Area <sup>2</sup>
R1	298270	8.8964X10 <sup>10</sup>
R2	144464	2.0869X10 <sup>10</sup>
R3	385097	1.4829X10 <sup>11</sup>
R4	163518	2.6738X10 <sup>10</sup>
R5	105433	1.1116X10 <sup>10</sup>
SUMATORIA DE AREAS	1096782	2.9597X10 <sup>11</sup>

Media

$$Y = \frac{1096782}{5} = 219356.4$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{5(2.9597 \times 10^{11}) - 1096782^2}{5(5 - 1)}} = 117668.8668$$

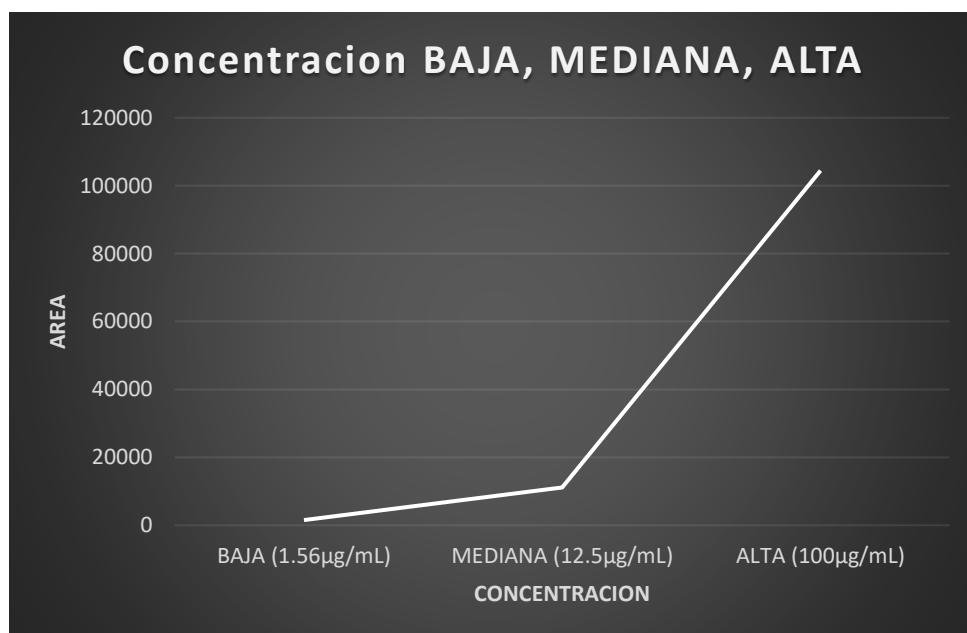
Coefficiente de variación

$$CV = \frac{117668.8668}{219356.4} \times 100 = 53.6427$$



**Anexo 5: Gráfica de Concentración baja, mediana y alta**

Concentración	AUC
BAJA (1.56 µg/mL)	1525
MEDIANA (12.5 µg/mL)	11115
ALTA (100 µg/mL)	104449



**Anexo 6: Parámetros de Desempeño**

<b>Parámetro de desempeño</b>	<b>Valoración</b>	<b>Limite</b>	<b>Identificación</b>
Precisión/adecuabilidad del sistema	SI	NO	SI
Linealidad del sistema	SI	NO	SI
Especificidad	*	NO	SI
Exactitud	SI	NO	SI
Repetibilidad	SI	NO	SI
Linealidad del método	SI	NO	SI
Precisión del método	SI	NO	SI
Estabilidad analítica de la muestra	SI	NO	SI
Límite de Detección	SI	SI	SI
Límite de Cuantificación	SI	SI	SI
Robustez	*	*	*
Tolerancia	*	*	*
Rango	SI	SI	SI

\*puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA**

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES, CACEI y CONACYT  
SGC certificado en la norma ISO 9001:2015

A Ve

**FORMA T-4A  
NOMBRAMIENTO COMITÉ REVISOR**

Cuernavaca, Mor., a 01 de junio de 2022

**M. en C. SILVIA MARQUINA BAHENA  
M. en C. MARÍA DEL CARMEN PÉREZ REDONDO  
DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ  
DRA. SANDRA IGNACIA RAMÍREZ JIMÉNEZ  
DRA. VALERI DOMÍNGUEZ VILLEGAS**

**P R E S E N T E**

Me permito comunicarles que han sido designadas integrantes del **COMITÉ REVISOR** del trabajo de: **TESIS**  
Titulado:

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA CUANTIFICACIÓN DE METIL DODONATO A**

Que presenta la **C. JOHANA ZINAY ALVARADO PÉREZ**  
Del programa educativo de: **QUÍMICO INDUSTRIAL**

*A T E N T A M E N T E  
Por una humanidad culta*

**DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ  
DIRECTORA**

**Se anexa firma electrónica**

**D I C T A M E N**

**DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ  
DIRECTORA DE LA FCQeI  
P R E S E N T E**

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTÁMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE	FIRMA
	M. en C. SILVIA MARQUINA BAHENA	
	M. en C. MARÍA DEL CARMEN PÉREZ REDONDO	
	DRA. MARÍA LUISA GARDUÑO RAMÍREZ	
	DRA. SANDRA IGNACIA RAMÍREZ JIMÉNEZ	
	DRA. VALERI DOMÍNGUEZ VILLEGAS	

**El voto del comité es aprobatorio, se anexan firmas electrónicas**

VALH/cco



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SANDRA IGNACIA RAMIREZ JIMENEZ | Fecha:2022-09-02 12:29:43 | Firmante

eBtMEgRP2Km4ztTUop3XNcbjK7XBcS+4BhC4p0Bx/qzAetmLbf0XyJT PeG SX8rALd0B1N5gRmGFmbGOFPvCruvCmw6D0truUCiOvFngIF OEt TgvcYc4majm13py1RO miadWNP+sbL+aeER7Zpwk0Cnh8lyao04R2dWE Vcy Y1zA8NlbjF3uM607rRj2YX)HMLBKI2UBHgrZc1rKwJ.Bm4q1r2X/Woc.O+T TxmVZosHGH63Dk Wg13b8wqjEm42QjPXRFSZ cWT dxZPpVnnaq2k1CZFxy0Ld88Lg5ofuxlB4gQ TwlBgyR8eEyp0Ekw8eSPOy0rQ==

VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS | Fecha:2022-09-02 13:22:42 | Firmante

kgBB2jH8uKvYnufjfgA4agjdN9g1b5oPmd5zjAAmDKJ7zwV9m96roqj120Ga hdl+Us+VBEvm7DhpR061eh9z2adKIGFnyYSH6M+OrnOLi0aCTWjKjDB4k1Pryy1hCSw8bc 68UNbkW8QJl08bz8ZzWf9pEwWw0Vfhes3aogHKLJywoO ssbz29G45Ljda6e4mR9CmRMErVpUad6Wwmyf8MbwWXS1RiGSzmb4cCpP3+592wOF 2daMqewT72BjG DpUIEz6Kl.br/7Y/N3UjvAKDw60z04KzVb6d6J0Hpg1UjFFNkz9fOw7odLQ==

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2022-09-02 13:50:14 | Firmante

agVYnSgNje0JpHZNpEu+RHfwmn2QTzZvkiYn0dw subApj+J01Pz0Y9c8QuLMLVzH2yCK+0XqeyLOfS97DB0A6J79QzMPuqg7sFjd3Qd93uOrFGmXjJ5cPWc3Bx2+Ds ogW4AKh89kbgFhB.J8NX8jRkTIBCMYP6ar ZYpl6XDVe71944V3ZMz3ZCy2Gvr8G5mXQ0JWEXN10gd+3pV0h+9ev0J.EgPpROOKXL2J+MQQ8ZH2aXukvRfP5CH88Hkkrqf negOzUPZGIMFQzIMz1DnE5+QnlngBazF1V8qfQJhgBwVdVKihK1NK2DNuk5wybygg==

MARIA DEL CARMEN PEREZ REDONDC | Fecha:2022-09-02 21:47:44 | Firmante

KKRMBJKC+bbfMq2V4REDnyj712q3i/bw32mCQqkBLAHKVAJbQ8ryc+JkXwkyE3qdpznCUAJMoDpPFVoDomgaxg57+ya0VZPh5jeuQhOzQzXfM DscoDPEFvQBEBWbc+G XbagjMLrvTSQvZSRRk8ym4UbfVvsj62dR7q1dK/Z5JUz2z6yS6PEQE8TghoDpZ9sajMTe6Mk8mtrPg8pA.k26H54HKCJZ89CWzqWISm3bFAEslEMYj66gaFKirYK1aKEos Ln77RapEzDtpWQz2y59PB1BmsZn6E9N07vA3z2yixf ou8aWG2gRhwGrPaS8Jg==

SILVIA MARQUINA BAHENA | Fecha:2022-09-06 12:24:57 | Firmante

BRTHL3zfAr8mD+2DP3ozJZZq4zABridLHGbfmE144Vszc7YGeCSelV8U5pFa6zTKnngSOWGZRHKWukhYCbXnwR2bZuTIYGpxSK1KeAwwd8ongg9jPPr+XZ8yUIMEExtmb T4FEDEfcaVnQmoQwkERW8gMvSj6R+BMDRcRABswymjY1wZKFTDSesjyITL46wJyP TF qgZ0EjG4UJ8zll1IBv4OH9NSEIKw2Pg8n88RYOxOvUHLNlypKqexS8nz9 EGTSBjyS8SwwoxmrvGZZXF8wMW KBppwB11ry5M4ig3PZnh0s3kqyV6oQRW6fpaQLJhQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica c  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



KD5ebiAWJ

<https://efirma.uaem.mx/hocRepudio/Cpvueko8gg5yTePV1226dxZ6fEr8Zz>

