

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN
DE COTININA COMO BIOMARCADOR EN ORINA HUMANA POR
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN UV-
VIS/DAD”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

LUIS GUILLERMO NÚÑEZ VÁSQUEZ.
HAROLD DANIEL STEVE SELVA SOLÓRZANO.

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, ABRIL DE 2014

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN
DE COTININA COMO BIOMARCADOR EN ORINA HUMANA POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN UV-
VIS/DAD”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
LUIS GUILLERMO NÚÑEZ VÁSQUEZ.
HAROLD DANIEL STEVE SELVA SOLÓRZANO.

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, ABRIL DE 2014

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN
DE COTININA COMO BIOMARCADOR EN ORINA HUMANA POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN UV-
VIS/DAD”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
LUIS GUILLERMO NÚÑEZ VÁSQUEZ.
HAROLD DANIEL STEVE SELVA SOLÓRZANO.

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ASESORES:
EXTERNO: DR. RODRIGO ANTONIO REYES GÓMEZ
INTERNO: DR. NÉSTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, ABRIL DE 2014

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FISCAL GENERAL

LIC. FRANCISCO CRUZ LETONA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

MSC. MARTÍN ENRIQUE GUERRA CÁCERES

SECRETARIO

LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA

LIC. NELSON MAURICIO COTO MENDOZA

La culminación del trabajo de tesis de la licenciatura, no es producto del esfuerzo que de forma individual hemos puesto, sino también de todas aquellas personas y circunstancias que se han visto involucrados a lo largo de estos años.

Sin dejar de lado el mérito propio por alcanzar ésta meta, sin olvidar que no he partido de cero, y que muchos han puesto su tiempo, esfuerzo y sabiduría para lograr alcanzar los conocimientos que hoy en día he puesto en práctica y que he demostrado con ésta investigación.

En este arduo y largo proceso, debo agradecer a muchas personas, que me han permitido ver más allá en el horizonte, que me han orientado y aconsejado, aquellos que me han enseñado y apoyado, ayudándome a llegar más lejos; y aquel grupo selecto de personas que me han ayudado con su cariño y amistad.

Le agradezco a Dios: aquella Energía, que me acompañó a lo largo de la carrera, que fue la fuente de inspiración en esta hermosa Ciencia, que permitió que conociéramos y entendiéramos su mayor creación: la materia.

Le doy gracias a mis padres: Franklin y Flor de María, por haberme apoyado y haberme dado las herramientas necesarias para luchar en esta sociedad, por el cariño que hasta hoy no ha faltado, por su aliento y estímulo que me hizo capaz de alcanzar esta meta.

A mis hermanos Geova, Josué y Rodrigo, por ser una parte importante de mi vida, por la unidad que ellos representan, por el apoyo y confianza que siempre me han proporcionado.

Agradezco a mi esposa Vicky y mi hijo Santiago, por apoyarme en la culminación de éste trabajo, por inspirarme, por ser el propósito de cada día, por no dejarme caer y ser lo más importante en mi vida, gracias.

Agradezco a todos mis profesores en la carrera, entre ellos el Dr. Luis Parada, porque cada uno aportó su tiempo, paciencia y conocimientos. Pero debo señalar entre ellos un mayor reconocimiento a dos docentes y asesores de tesis: Dr. Néstor Guillermo Orellana y Dr. Rodrigo Antonio Reyes; a quienes considero unos grandes científicos y de una altura aún mucho mayor como personas. Quienes me han permitido disfrutar y compartir sus conocimientos, su confianza, integridad y sentido común.

Agradezco al Instituto Científico de Desarrollo Empresarial, por permitirnos realizar la investigación en las instalaciones de su laboratorio y depositar la confianza en el manejo de equipos y materiales, por habernos acogido como parte del grupo de trabajo del laboratorio.

Agradezco a todos aquellos compañeros y amigos que estuvieron en mi entorno universitario, en especial a mi gran amigo y compañero de tesis: Luis Núñez, por su ingenio, empatía, carisma, y confianza que ha demostrado en todos estos largos años de amistad.

A todos les debo mi gratitud por su consideración y paciencia.

“Si he visto más lejos es porque estoy sentado en hombros de gigantes” – Isaac Newton

Harold Daniel Steve Selva Solórzano.

A Dios:

Por estar siempre presente en mi vida, no abandonarme, por darme fortaleza y sabiduría en mis decisiones y haberme regalado culminar una carrera que me ayudo a ver y creer, en lo que no se ve y es difícil creer.

A mis padres:

Por ayudarme a perseverar en todo momento, tenerme paciencia y por hacer de mi quien soy, ambos son fuente de inspiración y una guía de cómo se debe vivir.

A mis hermanos:

Ernesto, Edgardo, Ana, José, Pedro, Juan, María y Rafael, por ser y hacerme saber que son, los que siempre estarán para darme una mano.

A Wendy:

Por ser una de las partes más importantes de mi vida y estar presente cada vez que te necesite y te necesitaré, por ser inspiración y musa en mis acciones gracias.

A los doctores Néstor Orellana y Rodrigo Reyes.

Por ser los entes mediadores para poder desarrollar esta tesis siempre agradecido con ustedes.

A mi compañero de fórmula:

Harold Selva, por ser la contraparte en el desarrollo de esta tesis, buen amigo y excelente persona, de lo mejor que gane durante esta carrera, que los trabajos, el compañerismo y la amistad no queden hasta aquí, gracias.

Agradezco también a las licenciadas Rosario de Zepeda y Ana Thelma de González, por ayudarnos con sus consejos y observaciones durante toda la carrera. Por ultimo pero no por eso menos importante, al Instituto Científico de Desarrollo Empresarial, por ser parte de este trabajo de investigación y permitírnos utilizar las instalaciones de su laboratorio.

GRACIAS TOTALES.

Luis Guillermo Núñez Vásquez.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO.	4
3.1 Origen del tabaco.	4
3.2 Componentes del tabaco.	5
3.2.1 Componentes de la hoja del tabaco.	5
3.2.2 Componentes del humo del tabaco.	5
3.3 Metabolismo de la nicotina.	6
3.3.1 Acción del humo de cigarro en el organismo.	6
3.3.2 Eliminación de la nicotina.	7
3.4 Epidemiología.	7
3.4.1 Tabaquismo en El Salvador.	7
3.4.2 Costos del tabaquismo en El Salvador.	8
3.4.3 Prevalencia del tabaquismo.	9
3.4.4 Corriente primaria y secundaria del humo de cigarro.	9
3.5 Acciones sobre el organismo.	10
3.5.1 Nicotina.	10
3.5.2 Monóxido de carbono.	10
3.5.3 Carcinógenos.	11
3.5.4 Las N-nitrosaminas.	12
3.5.5 Sustancias oxidantes.	12
3.6 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).	12
3.7 Características farmacológicas de la nicotina.	14
3.8 Absorción de la nicotina.	15
3.9 Distribución.	15
3.10 Extracción asistida por ultrasonido.	15
3.11 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.	16
3.12 Validación del método	19
3.12.1 Selectividad	20
3.12.2 Curva de Calibración	20
3.12.3 Exactitud	20

3.12.4	Precisión	20
3.12.5	Recobro	20
3.12.6	Estabilidad de la Muestra	21
3.12.7	Proceso de validación del método	21
4.	OBJETIVOS	22
4.1	OBJETIVO GENERAL	22
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	23
5.1	Condiciones Cromatográficas.	23
5.2	Extracción de cotinina.	23
5.3	Validación del Método.	23
5.3.1	Selectividad.	23
5.3.2	Efecto de Arrastre	24
5.3.3	Exactitud	24
5.3.4	Precisión	25
5.3.5	Límite de Cuantificación	27
5.3.6	Curva de Calibración	28
5.3.7	Recobro	29
5.3.8	Estabilidad de la muestra	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1	Materiales, reactivos y equipo de laboratorio	31
6.2	Muestra	32
6.3	Optimización de las condiciones cromatográficas	32
6.4	Validación del método analítico	35
6.4.1	Selectividad	35
6.4.2	Efecto de Arrastre	37
6.4.3	Exactitud	37
6.4.4	Precisión	41
6.4.5	Recobro	47
6.4.6	Curva de Calibración	50
6.4.7	Estabilidad de la muestra	57

6.1	Análisis de muestras fumador activo y pasivo.	64
7.	CONCLUSIONES	66
8.	RECOMENDACIONES	68
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Carcinógenos del humo del tabaco.</i>	11
Tabla 2. <i>Sustancias oxidantes del humo del tabaco.</i>	12
Tabla 3. <i>Características generales de los voluntarios.</i>	32
Tabla 4a. <i>Resultados para el nivel de concentración 1000 ngmL⁻¹</i>	38
Tabla 4b. <i>Resultados para el nivel de concentración 2000 ngmL⁻¹</i>	39
Tabla 4c. <i>Resultados para el nivel de concentración 3000 ngmL⁻¹</i>	40
Tabla 5a. <i>Resultados para el nivel de concentración 1000 ngmL⁻¹</i>	41
Tabla 5b. <i>Resultados para el nivel de concentración 2000 ngmL⁻¹</i>	43
Tabla 5c. <i>Resultados para el nivel de concentración 3000 ngmL⁻¹</i>	45
Tabla 6a. <i>Curva de calibración con estándar.</i>	47
Tabla 6b. <i>Resultados estadísticas de regresión para curva de calibración con estándar puro</i>	48
Tabla 6c. <i>Resultados análisis de varianza para curva de calibración con estándar puro</i>	49
Tabla 6d. <i>Comparación de resultados entre analista 1 y 2, para niveles de concentración de 100, 4000 y 8000 ngmL⁻¹.</i>	49
Tabla 7a. <i>Resultados para curva de calibración.</i>	51
Tabla 7b. <i>Resultados para límite de cuantificación.</i>	52
Tabla 8. <i>Resultados iniciales para estabilidad.</i>	58
Tabla 9. <i>Resultados para el primer Ciclo de congelación-descongelación.</i>	58
Tabla 10. <i>Resultados para el segundo ciclo de congelación-descongelación.</i>	60
Tabla 11. <i>Resultados para el tercer Ciclo de congelación-descongelación.</i>	61
Tabla 12. <i>Resultados para la estabilidad post preparativa.</i>	62
Tabla 13. <i>Resultados para el análisis de muestras de fumador activo y pasivo.</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Nicotiana Tabacum.</i>	4
Figura 2.	<i>Estructuras de los principales metabolitos de la Nicotina.</i>	7
Figura 3.	<i>Impacto de las medidas de prevención del tabaquismo.</i>	9
Figura 4.	<i>Partículas tóxicas, puntos de afección en el organismo y enfermedades desarrolladas.</i>	10
Figura 5.	<i>Mecanismos inflamatorios en la EPOC.</i>	13
Figura 6a.	<i>El estrés oxidativo en la EPOC.</i>	14
Figura 6b.	<i>Desequilibrio proteasa-antiproteasa.</i>	14
Figura 7.	<i>Esquema de un cromatógrafo líquido (HPLC).</i>	17
Figura 8.	<i>Detector de longitud de onda variable.</i>	18
Figura 9.	<i>Detector con Arreglo de fotodiodos</i>	19
Figura 10.	<i>Condición 1</i>	33
Figura 11.	<i>Condición 2</i>	33
Figura 12.	<i>Condición 3</i>	34
Figura 13.	<i>Condición 4</i>	34
Figura 14.	<i>Cromatogramas correspondientes a la prueba de Selectividad.</i>	36
Figura 15.	<i>Vista general del Detector de Arreglo de Foto Diodos</i>	36
Figura 16.	<i>Cromatograma correspondiente a prueba de Efecto Arrastre.</i>	37
Figura 17.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Exactitud a 1000 ngmL⁻¹</i>	38
Figura 18.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Exactitud a 2000 ngmL⁻¹</i>	39
Figura 19.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Exactitud a 3000 ngmL⁻¹</i>	40
Figura 20.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 1000ngmL⁻¹ por Analista 1</i>	42
Figura 21.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 1000ngmL⁻¹ por Analista 2</i>	42
Figura 22.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 2000ngmL⁻¹ por Analista 1</i>	44
Figura 23.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 2000ngmL⁻¹ por Analista 2</i>	44
Figura 24.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 3000ngmL⁻¹ por Analista 1</i>	46
Figura 25.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 3000ngmL⁻¹ por Analista 2</i>	46
Figura 26.	<i>Curva de Calibración</i>	52
Figura 27.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 100ngmL⁻¹</i>	53
Figura 28.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 300ngmL⁻¹</i>	53
Figura 29.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de</i>	54

	<i>Curva de Calibración a 1000ngmL⁻¹</i>	
Figura 30.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 2000ngmL⁻¹</i>	54
Figura 31.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 2500ngmL⁻¹</i>	55
Figura 32.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 3000ngmL⁻¹</i>	55
Figura 33.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 4000ngmL⁻¹</i>	56
Figura 34.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 6000ngmL⁻¹</i>	56
Figura 35.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 8000ngmL⁻¹</i>	57
Figura 36.	<i>Cromatograma del primer ciclo de congelación-descongelación para 1000ngmL⁻¹</i>	59
Figura 37.	<i>Cromatograma del primer ciclo de congelación-descongelación para 3000ngmL⁻¹</i>	59
Figura 38.	<i>Cromatograma del segundo ciclo de congelación-descongelación para 1000ngmL⁻¹</i>	60
Figura 39.	<i>Cromatograma del segundo ciclo de congelación-descongelación para 3000ngmL⁻¹</i>	60
Figura 40.	<i>Cromatograma del tercer ciclo de congelación-descongelación para 1000ngmL⁻¹</i>	61
Figura 41.	<i>Cromatograma del tercer ciclo de congelación-descongelación para 3000ngmL⁻¹</i>	61
Figura 42.	<i>Estabilidad al congelar-descongelar para 1000 ngmL⁻¹ y 3000 ngmL⁻¹ % de Recuperación vs Tiempo en días.</i>	62
Figura 43.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de estabilidad post preparativa para 1000ngmL⁻¹</i>	63
Figura 44.	<i>Cromatograma correspondiente al parámetro de estabilidad post preparativa para 3000ngmL⁻¹</i>	63
Figura 45.	<i>Cromatograma correspondiente a muestra de fumador activo</i>	65
Figura 46.	<i>Cromatograma correspondiente a la muestra del fumador pasivo</i>	65

1. RESUMEN

El humo de tabaco es un producto tóxico y perjudicial, que implica un riesgo para la salud del fumador y para las personas que lo rodean. En la combustión del tabaco se han identificado más de 4000 compuestos diferentes entre los cuales, por lo menos sesenta se reconocen como cancerígenos. Debido a la presencia de estos compuestos, los gobiernos han establecido leyes con el objetivo de proteger la salud de la población.

La nicotina es uno de los principales componentes del tabaco, responsable de la adicción al cigarrillo; es una droga de altísimo poder adictivo debido a que los receptores nicotínicos específicos cerebrales son activados casi instantáneamente, luego de su inhalación.

La cotinina es el principal metabolito de la nicotina y es el biomarcador más utilizado para la cuantificación de la exposición al humo de tabaco; el cual puede ser medido mediante la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés).

Hasta la fecha en el país, los estudios relacionados con el tratamiento del tabaquismo, limitan la información sobre el progreso de la enfermedad únicamente a los resultados de encuestas de dependencia a la nicotina, sin contraste de esta información con la determinación de niveles de exposición con marcadores biológicos, restringiendo así, la posibilidad de desarrollar una investigación que ayude a construir el contexto epidemiológico del tabaquismo y sus avances en aspectos de tratamiento a nivel nacional.

Una correcta valoración del tabaquismo resulta fundamental para realizar un tratamiento efectivo. Los profesionales sanitarios deben estar preparados para diagnosticarlo y tratarlo adecuadamente. Por ello, es conveniente definir parámetros clínicos sustentados con pruebas analíticas que lleven a establecer un correcto diagnóstico

En esta investigación se validó un método para determinar los niveles de cotinina en fumadores, lo cual constituye una herramienta que aportará recursos científicos y enriquecerá la información que las autoridades de salud tienen disponible actualmente para valorar el tratamiento y darle un seguimiento más estrecho a personas con la enfermedad del tabaquismo.

2. INTRODUCCIÓN

El consumo de tabaco es la causa de morbilidad y mortalidad prematura más importante en el mundo, sobre la cual se puede impactar con medidas preventivas. Las consecuencias de fumar son bien conocidas; incluyen un aumento del riesgo de contraer cáncer, enfisema y enfermedad cardiovascular. Además, el humo de tabaco es reconocido como carcinógeno y la exposición persistente al mismo está asociada con mayor riesgo de sufrir cáncer de pulmón y otras enfermedades; los niños especialmente, pueden incrementar la frecuencia de enfermedades asmáticas y del tracto respiratorio bajo, como bronquitis y neumonía, por lo que puede afirmarse que el tabaquismo genera un impacto significativo en términos de gasto sanitario. [EPA, 2007]

Los biomarcadores o metabolitos que resulten de su biotransformación o cualquier alteración bioquímica precoz, cuya determinación en los fluidos biológicos, tejidos o aire exhalado permiten determinar la intensidad de exposición o riesgo para la salud. [Augusto, 2006]. Son muy utilizados como instrumentos en los estudios epidemiológicos, en la clasificación de la exposición al humo de tabaco, para poder medir el grado de susceptibilidad y el nivel de afectación en la salud producido por el tabaquismo. Entre los marcadores de exposición al tabaco se incluyen carboxihemoglobina, ión tiocianato, nicotina y cotinina. La Nicotina es un marcador específico, pero tiene el defecto de poseer de una vida media muy corta, inferior a 2 horas, por lo que no se acumula, ni persiste durante largos períodos de tiempo. La nicotina se metaboliza en dos metabolitos principales: N-óxido-nicotina y cotinina. [Benowitz, 1996],

La cotinina es el principal metabolito de degradación de la nicotina y es generalmente considerado el mejor biomarcador de consumo de tabaco en fumadores activos y de exposición ambiental al tabaco en los fumadores pasivos, porque posee una vida media de 18 a 20 horas, de modo que al medir los niveles de cotinina en el organismo podemos determinar la cantidad de nicotina a la que se estuvo expuesto. [Tutka, 2005], [Arresegor, 2006]

Existe una variedad de métodos analíticos reportados en la literatura para determinar nicotina y cotinina en fluidos biológicos, entre ellos el método de Radioinmunoensayo (RIA) que aunque es muy sensible carece de especificidad y está limitado a los laboratorios que pueden producir los anticuerpos para su aplicación; otros métodos analíticos utilizados son las técnicas cromatográficas, que permiten una adecuada separación y cuantificación. Dentro de estas técnicas la más utilizada es la de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector ultravioleta. [Vacchino, 2006]

En esta investigación se implementó y validó un método utilizando la técnica de cromatografía líquida con detector UV para determinar los niveles de cotinina en orina. Los

análisis se realizaron en el Laboratorio del Instituto Científico de Desarrollo Empresarial (ICDE, I+D+i). Los parámetros especificados por Gokani y Rabbaa-Khabbaz, serán evaluados y se utilizarán los valores óptimos de acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio. [*Gokani, 2004*], [*Rabbaa, 2006*]

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 Origen del tabaco.

La costumbre de inhalar el humo de determinadas plantas parece remontarse casi hasta el descubrimiento del fuego. Es bastante probable que tal costumbre se asociase a una serie de ritos mágicos, adivinatorios o curativos. El tabaco se utilizaba en forma medicinal y ritual. Gracias al comercio de los mayas con los olmecas y otros pueblos, el uso del tabaco se extendió hasta América del Norte y Canadá. [Yanie B., 2000]

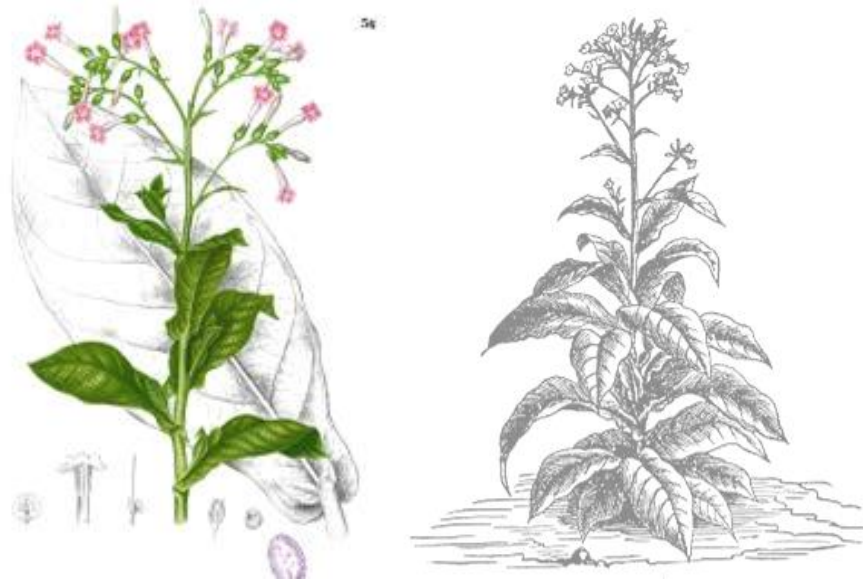


Figura 1. Nicotiana Tabacum.

La planta del tabaco, "*Nicotiana Tabacum*", de cuyas hojas se obtienen diversos productos destinados al consumo humano: cigarrillos, cigarros puros, picadura de pipa, rapé, tabaco de mascar y otros, es originaria de la zona del altiplano andino, aunque cuando fue colonizada por los europeos ya se había extendido por todo el continente.

Según su variedad, el tabaco contiene entre 0.5 y 16% de nicotina. El resto es alquitrán, una sustancia oscura y resinosa compuesta por varios agentes químicos, muchos de los cuales se generan como resultado de la combustión (cianuro de hidrógeno, monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxido de nitrógeno, amoníaco). Como la industria del tabaco está sometida a regulaciones de calidad y este producto es relativamente barato, no suele adulterarse.

Las hojas de tabaco son procesadas en láminas, mezcladas con diferentes aditivos específicos para mejorar el sabor y otras características, y cortadas para hacer cigarrillos. El tabaco es envuelto en una lámina de papel y se coloca un filtro que contiene materiales como carbón, con canales u orificios para la entrada de aire. [Antonio, 2006]

3.2 Componentes del tabaco.

3.2.1 Componentes de la hoja del tabaco.

El agua constituye el 80% del peso total de la hoja antes de ser cortada y sólo un 18% después del proceso de curado. La materia seca está formada a su vez por sustancias orgánicas (75-89%), que se dividen en nitrogenadas, no nitrogenadas y sustancias inorgánicas.

La composición de la hoja del tabaco es la siguiente:

1. Agua (80)%
2. Materia Seca (20)%
 - Compuestos Inorgánicos (11 - 25)%
 - Compuestos Orgánicos (75 - 89)%
 - o Nitrogenados
 - ❖ Aminoácidos
 - ❖ Amoníaco
 - ❖ Proteínas
 - ❖ Alcaloides (Nicotina)
 - o No Nitrogenados
 - ❖ Hidratos de Carbono
 - ❖ Pectinas
 - ❖ Resinas
 - ❖ Glucósidos
 - ❖ Aceites Etéricos
 - ❖ Ácidos Grasos
 - ❖ Polifenoles
 - ❖ Sustancias Aromáticas.

3.2.2 Componentes del humo del tabaco.

La determinación de los componentes del humo del tabaco se realiza haciéndolo pasar a través de un filtro tipo *Cambridge*, formado por agujas de vidrio que funcionan como barrera. El filtro, deja pasar las sustancias en fase gaseosa y retiene las partículas de tamaño inferior a 0,3 μm de diámetro de la fase de partícula. [Jiménez, 1995]

Los constituyentes más importantes de la fase gaseosa y de la fase de partícula son:

Fase gaseosa

- ✓ Óxidos de carbono
- ✓ Óxido nitroso
- ✓ Metano
- ✓ Acetaldehído
- ✓ Isopreno
- ✓ Acetona
- ✓ Cianidina de hidrógeno

Fase de partícula

- ✓ Alquitrán
- ✓ Agua
- ✓ Nicotina
- ✓ Fenol
- ✓ Catecol
- ✓ Pireno
- ✓ Benzo (a) pireno

- ✓ 2-butanona
- ✓ Tolueno
- ✓ Acetonitrilo
- ✓ Acroleína
- ✓ Amoníaco
- ✓ Benceno
- ✓ Dimetilnitrosamina
- ✓ Nitrosopirrolidina
- ✓ Nitrobenceno
- ✓ 2,4 dimetil-fenol
- ✓ Cresol
- ✓ Etil-fenol
- ✓ Sigmasterol
- ✓ Fitosteroles
- ✓ Indol 2

3.3 Metabolismo de la nicotina.

3.3.1 Acción del humo de cigarro en el organismo.

El tamaño de las partículas del humo del tabaco determina el lugar de depósito en la vía aérea o los alveolos del pulmón y muchos de los constituyentes de la fase gaseosa son absorbidos a través de la membrana alveolo-capilar. Tras ser inhaladas, el tamaño de las partículas puede variar con el aumento de humedad en la vía aérea y la agregación de partículas debido a su alta concentración. [Burns, 1991]

Aproximadamente 8 segundos después de haber entrado a los pulmones, la nicotina contenida en el tabaco alcanza el torrente sanguíneo y en menos de 5 minutos traspasa la barrera hematoencefálica para llegar al cerebro. Sus efectos duran entre 5 y 10 minutos provocando fases de acción estimulante y acción depresora del sistema nervioso central.

En primera instancia, estimula algunos receptores sensitivos y produce una descarga de adrenalina que acelera la frecuencia cardiaca y eleva la presión arterial. Posteriormente, deprime todos los ganglios autónomos del sistema nervioso periférico. [Antonio, 2006]

La nicotina se metaboliza principalmente en el hígado y en menor medida en los riñones y los pulmones. Los metabolitos primarios de la nicotina son la cotinina y la nicotina-N-óxido. De esta forma el 70% de la nicotina se transforma en cotinina, el 4% en nicotina-N-óxido y un 9% se elimina sin modificarse. Los principales metabolitos de la nicotina pueden observarse en la figura 2.

La Cotinina es un compuesto inactivo y un excelente marcador biológico para el estudio de pacientes fumadores, ya que tiene una vida media de unas 16-20 horas (con un rango 11-37 horas), persistiendo en el organismo unos 4 días desde que la persona deja de fumar; aparece en la sangre del fumador a los pocos minutos de haber consumido tabaco, sus niveles plasmáticos fluctúan mucho menos que los de la nicotina y es fácilmente cuantificable en sangre, saliva y orina. Se considera indicativo de fumador activo un nivel de cotinina en saliva mayor de 40 mgmL⁻¹. [Torrecilla, 2001]

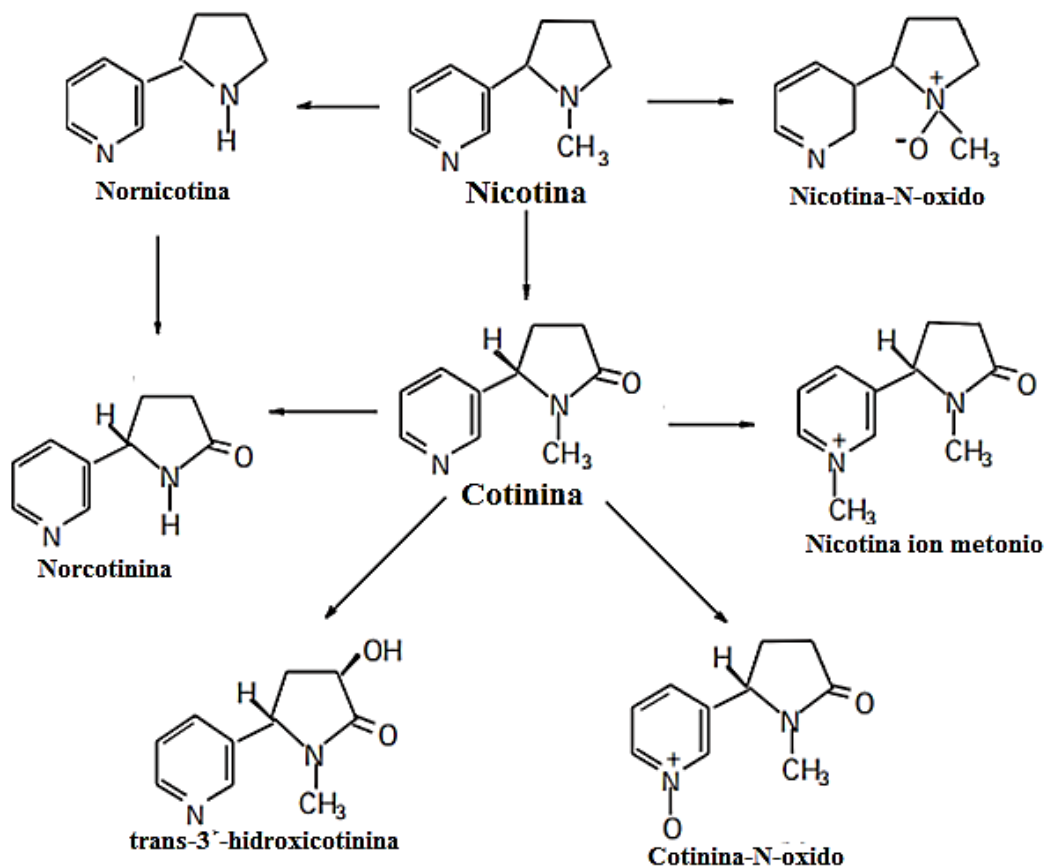


Figura 2. Estructuras de los principales metabolitos de la Nicotina. [Benowitz, 1996]

3.3.2 Eliminación de la nicotina.

La eliminación de la nicotina y sus metabolitos tiene lugar fundamentalmente en el riñón. El pH ácido de la orina favorece su eliminación, mientras que el pH alcalino la disminuye. La cotinina en orina empieza a detectarse a las dos horas desde su consumo y a las 72 horas se ha eliminado en más del 90%. Un 10% de la cotinina y toda la nicotina-N-óxido se eliminan sin metabolizar. Otra importante forma de excreción de la nicotina y sus metabolitos es la saliva. [Torrecilla, 2001]

3.4 Epidemiología.

El tabaco mata anualmente alrededor de 5 millones de personas en todo el mundo. De acuerdo a proyecciones oficiales se espera que para el año 2020 la cifra se incremente a 10 millones de personas. En América, las muertes asociadas con el humo de tabaco representan un total de 1,1 millones de personas y 600,000 de ellas son de América Latina y el Caribe.

3.4.1 Tabaquismo en El Salvador.

En El Salvador, se estima que se producen alrededor de 5,000 muertes anuales por enfermedades directamente asociadas al consumo de tabaco siendo las principales: todos

los tipos de cáncer, las enfermedades cardiovasculares, los accidentes cerebrovasculares e infarto agudo al miocardio y enfermedades pulmonares obstructivas crónicas.

Según estadísticas del Ministerio de Salud de El Salvador, en el año 2009 se cuantificaron un total de 827 consultas por primera vez, de pacientes que adolecen diferentes tipos de cáncer; 1,287 por accidentes cerebro vasculares, 448 por infartos cardíacos y 9,951 consultas por enfermedades pulmonares, todas ellas asociadas al consumo de tabaco. El consolidado de datos del Ministerio de Salud y el Instituto de Medicina Legal, reporta un total de 154 muertes de pacientes que adolecían de cáncer del tracto respiratorio, asociado directamente al tabaquismo. *[PAHO]*

3.4.2 Costos del tabaquismo en El Salvador.

Según la OMS, el tabaco le cuesta a la economía mundial \$200 mil millones de dólares al año en la provisión de servicios de salud. En El Salvador, el costo estimado de la atención únicamente de los pacientes con cáncer vinculados al consumo de tabaco, se calcula en alrededor de 15.5 millones de dólares al año.

Asimismo, genera un enorme costo humano en aquellas personas que sufren de discapacidad por padecer enfermedades vinculadas al tabaco, como la dependencia de oxígeno en aquellos pacientes que sufren de cáncer y otras enfermedades pulmonares, discapacidad completa o parcial en aquellas personas que sufren de infartos cerebrales o cardíacos, impactando directamente en la economía familiar por tratarse de personas en edad productiva. Ante este panorama, se realiza un esfuerzo mundial para el control y regularización del consumo de tabaco a través de un convenio internacional para la creación de leyes en cada país. *[Saiz, 2003]*

La epidemia mundial de tabaquismo mata cada año a casi 6 millones de personas, de las cuales más de 600 mil son no-fumadores y mueren por respirar humo ajeno. Sólo cinco países de América Latina prohíben totalmente la publicidad, promoción y patrocinio del tabaco, estos son Panamá, Colombia, Brasil, Chile y Surinam.

Entre las medidas de prevención del tabaco se encuentran: incremento fiscal, espacios sin humo de tabaco, información en el Marco Mundial del Control de Tabaco (MMCT) prohibición de publicidad, imágenes en cajetillas, el financiamiento de tratamientos, encuestas por líneas telefónicas y otros. Pero no todas tienen el mismo impacto como lo podemos observar en la figura 3. *[CNPT, 2010]*.

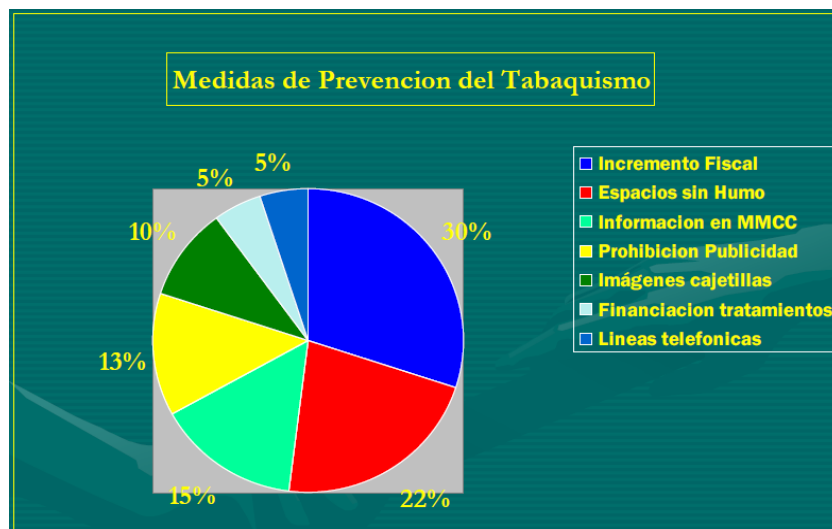


Figura 3. Impacto de las medidas de prevención del tabaquismo.

3.4.3 Prevalencia del tabaquismo.

En El Salvador en el 2009, la prevalencia de tabaquismo en la población adulta fue de 21,6% en los hombres y 3,4% en las mujeres, mientras que la prevalencia de tabaquismo en los adolescentes fue de 27% (32,6% en los hombres y 21,3% en las mujeres); 15% de los adolescentes fumaron su primer cigarrillo antes de los 10 años, 58% quisiera dejar de fumar y 74% ha recibido apoyo para dejar de fumar. El Salvador no ha ratificado el Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco; sin embargo, recientemente aprobó una ley sobre el control del tabaco que regula la comercialización, los espacios libres de humo, la publicidad, la promoción y el patrocinio, así como aspectos relacionados con el contrabando. [Saiz, 2003]

3.4.4 Corriente primaria y secundaria del humo de cigarro.

El hecho de fumar es un proceso basado en la combustión del tabaco. Cuando el fumador consume un cigarrillo se generan dos corrientes de humo: una, llamada corriente primaria o principal que atraviesa toda la columna del cigarro y el filtro, luego es aspirada por el fumador pasando al interior de su aparato respiratorio, y la otra corriente, conocida como secundaria o lateral, producida por la combustión del tabaco sin mediar aspiración.

Aproximadamente, el 75% del humo del cigarrillo es corriente secundaria y sólo el 25% corriente primaria. La corriente primaria es la causante de las patologías en el fumador activo, mientras que la corriente secundaria junto con el humo exhalado por el fumador, afecta a los fumadores pasivos. Inicialmente se pensaba que la composición de la corriente secundaria era la misma que la de la corriente principal. Estudios realizados en los últimos años, con análisis químicos de la corriente secundaria, han puesto de manifiesto que poseen diferentes concentraciones de las sustancias presentes en el humo del tabaco; e incluso la concentración de determinados componentes tóxicos es muy superior en la corriente

primaria, como las N-nitrosaminas, monóxido de carbono, acroleína y amoniaco. [E.P.A. 2002]

3.5 Acciones sobre el organismo.

El conocimiento de la composición exacta del humo del tabaco continúa siendo un problema para los investigadores. Las partículas más dañinas e importantes, desde el punto de vista sanitario, están perfectamente identificadas y se presentan en la figura 4.

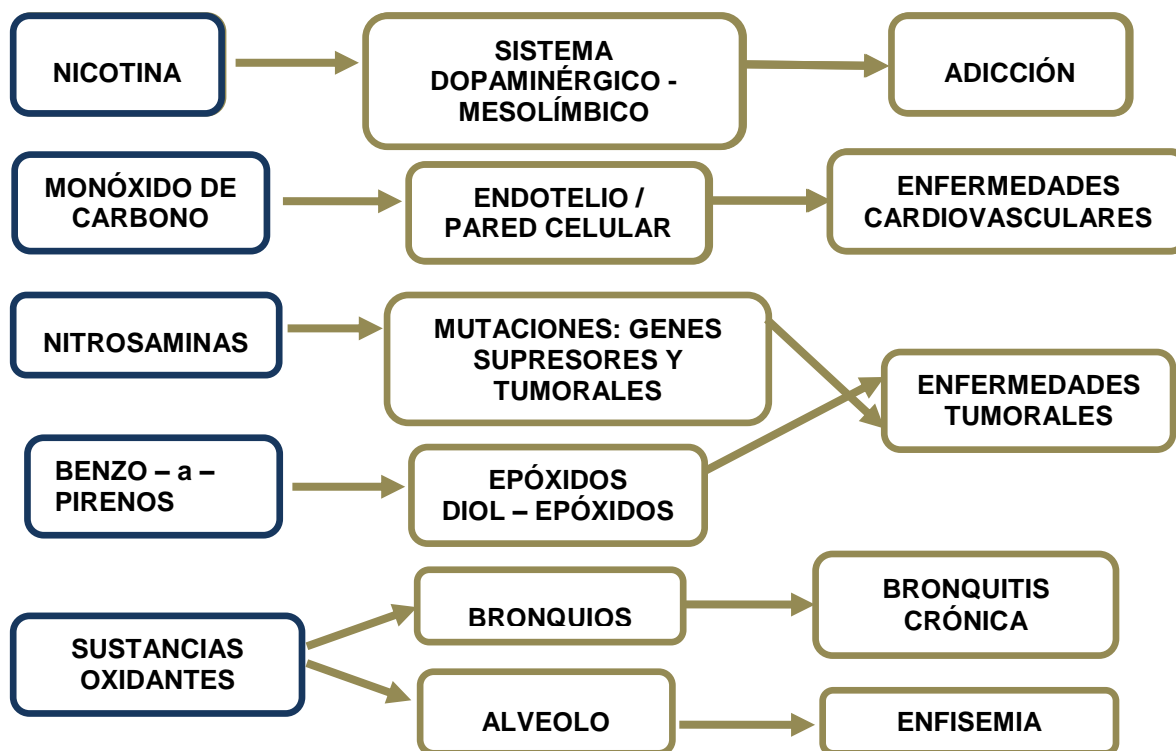


Figura 4. Partículas tóxicas, puntos de afección en el organismo y enfermedades desarrolladas.

3.5.1 Nicotina.

La nicotina es un alcaloide natural presente en las hojas del tabaco. Su síntesis se realiza en la raíz de la planta, asciende a través de la savia y se deposita en las hojas en gradiente de concentración, de forma que las hojas situadas en la parte más alta tienen más nicotina que las situadas en la parte baja. Una vez absorbida por el organismo pasa rápidamente al torrente sanguíneo, obteniéndose el nivel más alto de nicotemia en los primeros minutos después de iniciar el consumo. Desde la sangre periférica, la nicotina va a actuar sobre los distintos órganos: los del sistema cardiovascular, debido a su actividad simpaticomimética; del sistema gastrointestinal, debido a su actividad parasimpaticomimética; del sistema endocrino-metabólico y del sistema nervioso central.

3.5.2 Monóxido de carbono.

El monóxido de carbono es un gas tóxico que se produce por combustión incompleta del tabaco y se encuentra en la fase gaseosa del humo del cigarrillo. La concentración depende

del tipo de presentación utilizada (los cigarrillos desprenden más CO que los puros), de la temperatura y rapidez de la combustión y del grado de contaminación atmosférica. El fumador inhala unos 400 mgL⁻¹ de este gas en cada inhalada. El CO inhalado atraviesa con facilidad la membrana alveolo-capilar y se combina activamente con la hemoglobina sanguínea, formando carboxihemoglobina (HbCO). La sangre de los fumadores tiene tasas más altas de HbCO que la de los no fumadores. El CO tiene una afinidad por la hemoglobina 20 veces superior a la del oxígeno. Esta unión determina que el aporte de oxígeno a los tejidos sea mucho menor. [Houezec, 1991]

3.5.3 Carcinógenos.

Se denominan carcinógenos a aquellas sustancias que actuando sobre una célula inducen alteraciones específicas cuyo resultado final es una manifestación tumoral. Existen varios tipos de carcinógenos:

- *Carcinógenos de acción directa*: capaces de causar por sí mismos, a la dosis apropiada, un cambio maligno (carcinógenos completos).
- *Carcinógenos de acción indirecta*: requieren una activación metabólica para comportarse como verdaderos carcinógenos, capaces de unirse a las macromoléculas de las células, fundamentalmente ADN y proteínas.

La mayoría de los carcinógenos del humo del tabaco se encuentran en los alquitranes. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las nitrosaminas son los carcinógenos más potentes (tabla 1). [Ramos et al. 2004]

Tabla 1. Carcinógenos del humo del tabaco.

Fase de partícula	Fase de gas
<ul style="list-style-type: none"> - Carcinógenos <ul style="list-style-type: none"> • Nitroso-nor-nicotina • Polonio-210 • Níquel • Cadmio • Arsénico - Cocarcinógenos <ul style="list-style-type: none"> • 9-metil-carbazol • Catecoles • Fenoles - Iniciadores <ul style="list-style-type: none"> • Benzo-a-pireno • Benzo-a-flúor anteno • 5 metil-criseno • Dibenzoantraceno • Benzoflúoranteno • Dibenzopireno 	<ul style="list-style-type: none"> - Carcinógenos <ul style="list-style-type: none"> • Dimetil-nitrosamina • Dietil-nitrosamina • Etil-metil-nitrosamina • Nitropirrolidina - Cocarcinógeno: <ul style="list-style-type: none"> • Formaldehído - Iniciador: <ul style="list-style-type: none"> • Uretano

3.5.4 Las N-nitrosaminas.

Son un grupo de sustancias que se producen durante el proceso de fabricación del tabaco y posteriormente, durante la combustión. Las nitrosaminas se comportan como procarcinógenos, ya que requieren activación metabólica para convertirse en carcinógenos completos y en esta activación están implicadas enzimas α -hidroxilasas. La principal acción de las nitrosaminas es actuar sobre la guanina, produciendo una alcalinización que permite la aparición de timidina.

Una mutación frecuente en los genes supresores tumorales de los fumadores es la traslocación de la guanina por timidina. En consecuencia, los genes supresores tumorales mutados no podrían realizar su función de inmunovigilancia de forma eficaz y se facilitaría el desarrollo de neoplasias en los fumadores. [Jiménez, 2000]

3.5.5 Sustancias oxidantes.

En el humo del tabaco se han detectado un gran número de sustancias con alta capacidad para producir estrés oxidativo, de alterar el equilibrio proteasas- antiproteasas y de activar la respuesta inflamatoria, principalmente de polimorfo nucleares y macrófagos. Los radicales oxigenados (ver tabla 2) son los más abundantes y los que presentan mayor capacidad oxidante. Cada inhalada de humo del cigarrillo contiene 107 moléculas oxidantes de las que 104 son radicales libres de oxígeno. Además, los radicales libres de oxígeno también se producen de forma endógena, a partir de las células inflamatorias activadas, como macrófagos y neutrófilos. [Georgina, 2006], [Soler, 2002]

Tabla 2. Sustancias oxidantes del humo del tabaco.

<ul style="list-style-type: none">➤ Óxidos de nitrógeno➤ Óxidos de carbono➤ Óxidos de azufre➤ Acroleína➤ Ácido cianhídrico➤ Ácido fórmico➤ Radicales tóxicos del oxígeno:<ul style="list-style-type: none">✓ Ión superóxido✓ Peróxido de hidrógeno✓ o Radical hidroxilo

3.6 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

Las partículas tóxicas actúan en dos lugares del aparato respiratorio de los fumadores: el árbol bronquial y los alveolos, favoreciendo el desarrollo de EPOC.

Su acción sobre la mucosa del árbol bronquial produce inflamación, destrucción de las células ciliadas, hipertrofia, hiperplasia glandular e hiperproducción de mucosa con características alteradas.

Cuando las sustancias oxidantes actúan sobre el alveolo (ver figura 5), producen un incremento de polimorfonucleares y macrófagos alveolares, los cuales liberan las proteasas y elastasas que tienen en su interior y generan sustancias oxidantes.

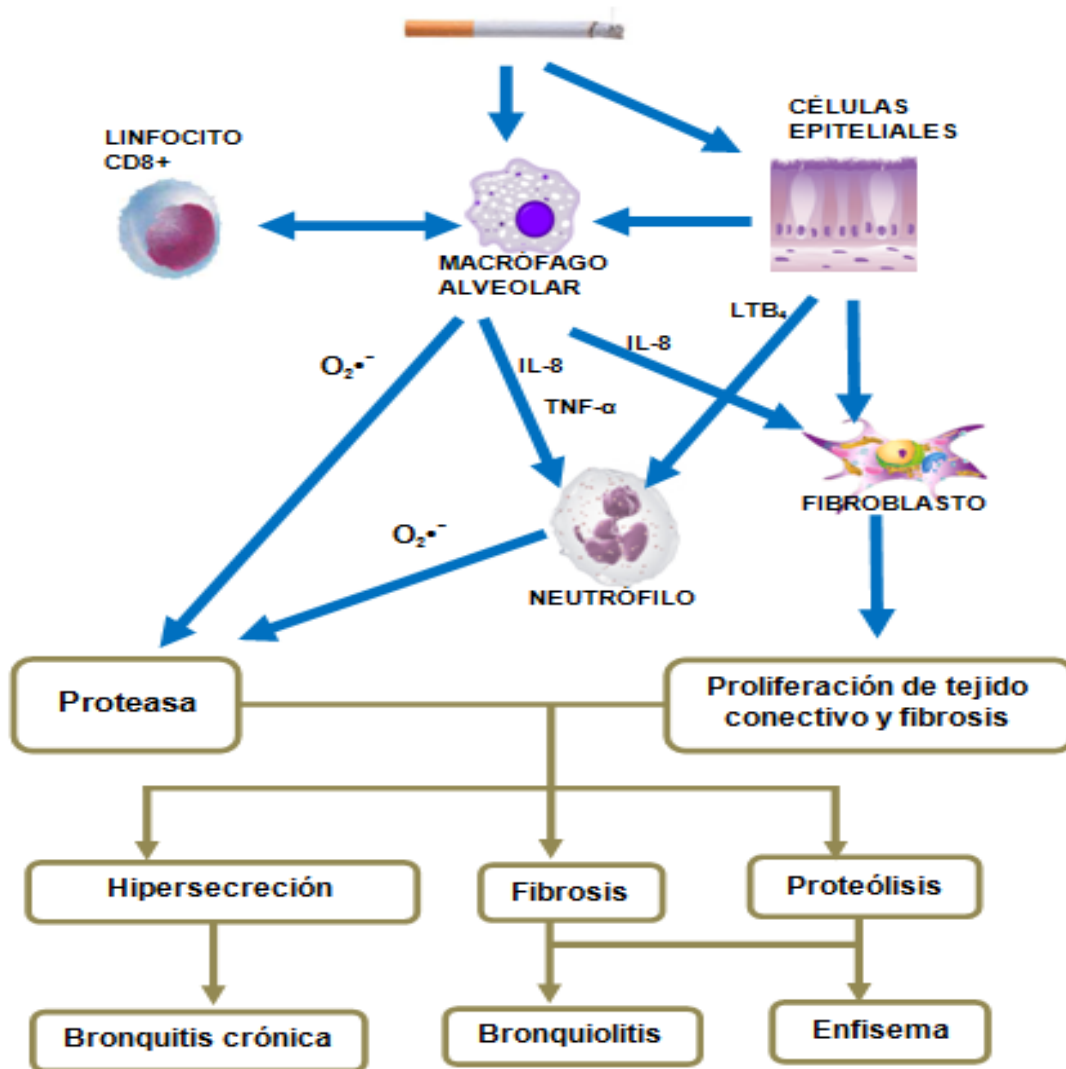


Figura 5. Mecanismos inflamatorios en la EPOC.

Estas enzimas aumentan la carga de proteasa en el pulmón del fumador y oxidan la enzima alfa-1- antitripsina, convirtiéndola en inactiva. Dicha enzima es la antiproteasa más importante del sistema respiratorio. Su función primordial es inactivar la elastasa y otras enzimas proteolíticas producidas por los neutrófilos, que son capaces de destruir el tejido

conectivo del pulmón. Su inactivación impide que pueda ejercer su acción defensiva sobre el pulmón, produciéndose una disminución de la carga antiproteasa. Este desequilibrio proteasa/antiproteasa, facilita el desarrollo de enfisema pulmonar en los fumadores por la progresiva destrucción del tejido conectivo (ver figura 6a y 6b). [Georgina, 2006], [Soler, 2002]

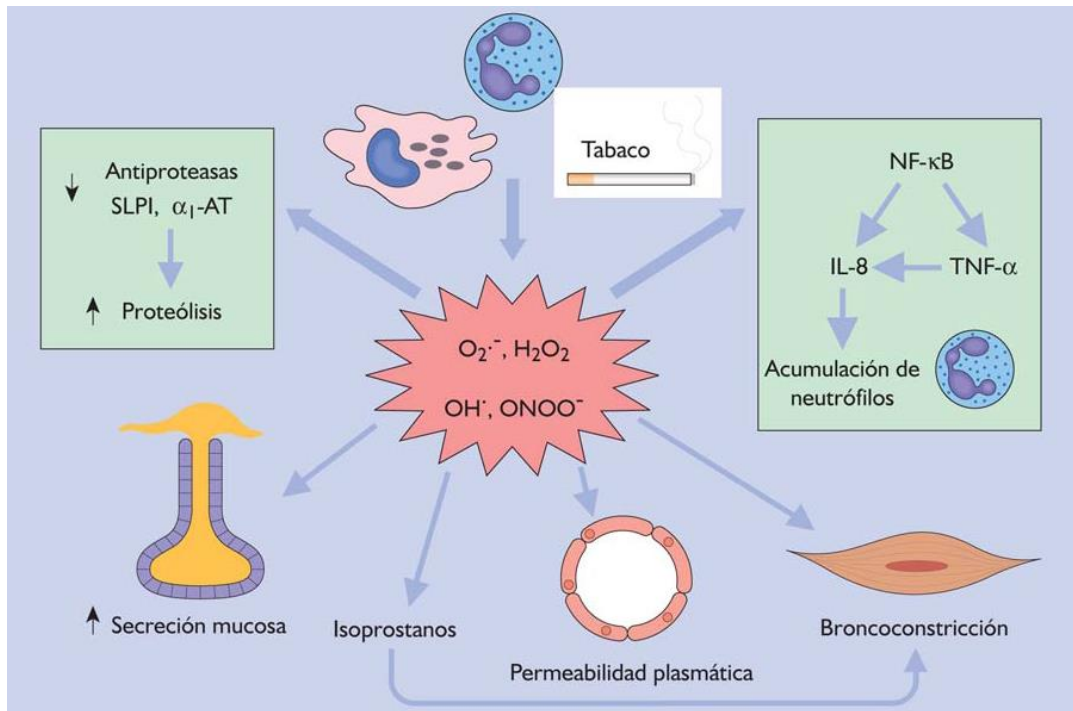


Figura 6a. El estrés oxidativo en la EPOC.

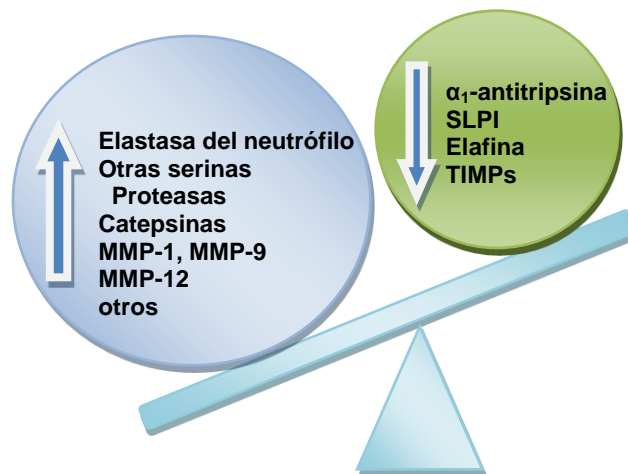


Figura 6b. Desequilibrio proteasa-antiproteasa.

3.7 Características farmacológicas de la nicotina.

La nicotina se sintetiza en las raíces de la planta del tabaco y es transportada por la savia hasta las hojas. La nicotina es un alcaloide natural, una amina terciaria de pH básico débil.

Se trata de una sustancia volátil e incolora, aunque en contacto con el aire se oscurece y toma color marrón. El isómero L-nicotina es la forma activa que se encuentra en el tabaco. [Benowitz, 1988.]

3.8 Absorción de la nicotina.

La absorción de la nicotina depende del pH. La nicotina se puede presentar de dos formas en equilibrio, según el pH del medio: una ionizada, cuya absorción es escasa y otra no ionizada muy liposoluble y atraviesa con facilidad las membranas celulares y se absorbe fácilmente en función del pH del tejido y del vehículo que transporta la nicotina (humo). Cuando el pH del medio es ácido, como el de los cigarrillos (pH 5.5), la nicotina tiende a estar ionizada, por lo que se absorbe poco a nivel de la boca. A nivel pulmonar la nicotina es tamponada a un pH fisiológico permitiendo su absorción. Por el contrario, cuando el pH es básico, como el humo de pipa o puros (pH 8.5), la nicotina tiende a estar en su forma no ionizada y se absorbe sobre todo en la mucosa bucal.

La cantidad de nicotina absorbida depende del hábito del fumador, tipo de administración, pH del humo y número de inhalaciones del cigarro. La absorción por la piel es mínima y está sujeta a variables como la temperatura, pH, grado de higiene e hidratación. La mayor parte de la nicotina absorbida en el tracto gastrointestinal es inactivada por la acción de los jugos gástricos y por las enzimas microsomiales hepáticas durante el primer paso a través del hígado. [Tutka, 2005]

3.9 Distribución.

La nicotina se absorbe rápidamente a nivel pulmonar dada la gran superficie de intercambio a nivel alveolo-capilar, llega al torrente sanguíneo y en pocos segundos los órganos principales pueden ser afectados por factores externos, alcanzando los receptores nicotínicos cerebrales a los 7-10 segundos, dos veces más rápido que si la nicotina se administrara de forma intravenosa. Esto origina una estrecha relación entre el hecho de fumar y los efectos que provoca a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC). [Lozano, 2006]

La nicotina es absorbida por el hígado y metabolizada principalmente a cotinina, la cual a su vez es eliminada por el riñón por medio de la orina. Para poder extraer y posteriormente separar y analizar la cotinina de la orina existen diversas técnicas de extracción siendo una de las más eficaces la extracción asistida por ultrasonido.

3.10 Extracción asistida por ultrasonido.

El sonido, incluyendo el ultrasonido, es transmitido a través de cualquier medio físico mediante ondas que comprimen y estiran el espacio molecular a través de su paso por el medio. Cuando una onda del ultrasonido causa una presión negativa suficiente a través de

un líquido, la distancia entre las moléculas del mismo excede la mínima distancia molecular requerida para mantener el líquido intacto, lo que origina que las fuerzas de cohesión se rompan y se crea un vacío que se denomina burbujas de cavitación.

Las colisiones entre las burbujas de cavitación constituyen la primera fuente de los efectos químicos y mecánicos de la energía de ultrasonido. Cada choque puede ser considerado como un microreactor en donde se crean instantáneamente temperaturas de varios miles de grados centígrados y presiones mayores a mil atmósferas. [Capelo, 2009]

Por lo general, la utilización de ultrasonidos ayuda a las técnicas de análisis químicos de diferentes formas:

- Acelerar técnicas de extracción líquido-líquido.
- Reducir extracción secuencial.
- Acelerar la extracción sólido – líquido de especies orgánicas.
- Acelerar reacciones enzimáticas.
- Favorecer la extracción sólido-líquido.
- Favorecer el desempeño de extracción y microextracción en fase sólida.
- Incrementar la precisión en técnicas de dispersión en matrices sólidas.

3.11 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

El término cromatografía deriva de las palabras griegas *chroma* (color) y *graphein* (escribir), aludiendo a que los pigmentos vegetales separados por Mikhail Semenovitch Tswett se ponen de manifiesto como bandas coloreadas.

Según la IUPAC, la cromatografía es un método físico de separación en que los componentes a ser separados están distribuidos entre dos fases, una que es fija (fase estacionaria) y la otra (fase móvil) que se mueve en una dirección definida.

La fase estacionaria es una de las dos fases que forman el sistema cromatográfico, ésta puede ser sólida, un gel o un líquido. Si es un líquido, ésta puede estar distribuida sobre un sólido y éste sólido, puede o no contribuir al proceso de separación.

La fase móvil es un fluido que se desplaza a través de la fase estacionaria, en una dirección definida, ésta puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico. [IUPAC, 1993]

Los métodos cromatográficos se clasifican atendiendo a la naturaleza de la fase móvil (gas, líquido o fluidos súper críticos), de la fase estacionaria (líquido o sólido), del soporte utilizado (columna, papel o placa), del mecanismo de separación (adsorción, reparto, intercambio iónico o permeación en gel).

La separación es debida a que las moléculas de soluto se distribuyen entre la fase estacionaria y la fase móvil, en función de la solubilidad relativa de cada una de ellas. A lo largo del sistema cromatográfico, los solutos se mueven a diferentes velocidades, dependiendo de su afinidad por la fase estacionaria respecto a la fase móvil.

La cromatografía líquida de alta eficiencia, es una técnica de separación basada en una fase estacionaria y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por partición, absorción, intercambio iónico, éstas dependerán de la fase estacionaria utilizada.

Los compuestos a ser determinados se disuelven en un disolvente apropiado, y las separaciones se dan, generalmente, a temperatura ambiente. Un Cromatógrafo líquido está constituido por un reservorio, el cual contiene la fase móvil, una bomba que ayuda a desplazar la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos como una computadora, un integrador o una grabadora (ver figura 7).
[USP, 2013]

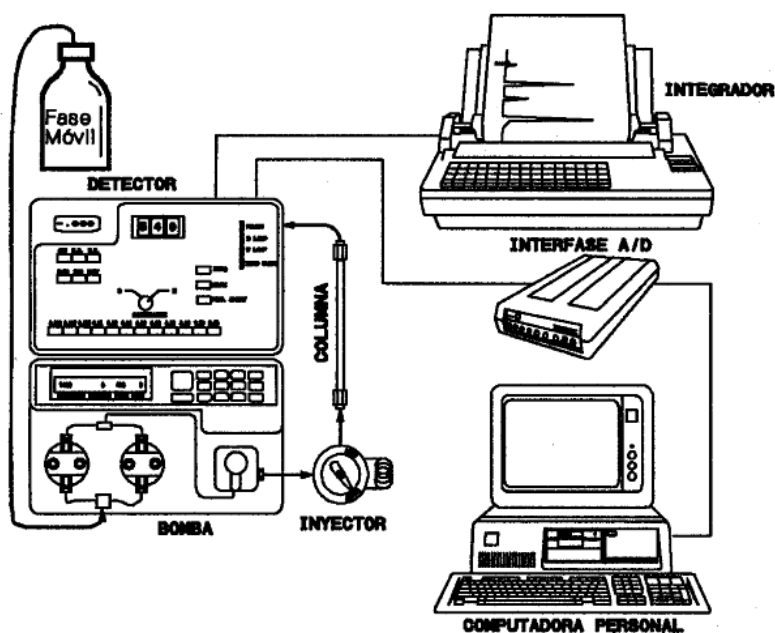


Figura 7. Esquema de un cromatógrafo líquido (HPLC).

El detector es la parte del sistema cromatográfico que permite “ver” y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. Éstos deben tener un amplio rango dinámico de respuesta, poseer una respuesta lineal, no contribuir al ensanchamiento de banda, responder a todos los solutos, tener sensibilidad apropiada, no afectarse por cambios de temperatura, poseer una buena relación señal/ruido, no destruir la muestra, tener una constante de tiempo baja.

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos, siendo los primeros los que miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura, como por ejemplo los detectores de índice de refracción y el de conductividad. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda definida; de igual forma el detector de fluorescencia, empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico (derivatización).

El detector UV es el más empleado en la HPLC, posee buena sensibilidad y rango lineal, además permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, los cuales deben ser transparentes a la longitud de onda de trabajo. El rango de operación de un detector UV es de los 190 nm a los 350 nm, y el UV-Vis desde los 190 a 700 nm generalmente. La concentración de la muestra responde a la Ley de Beer.

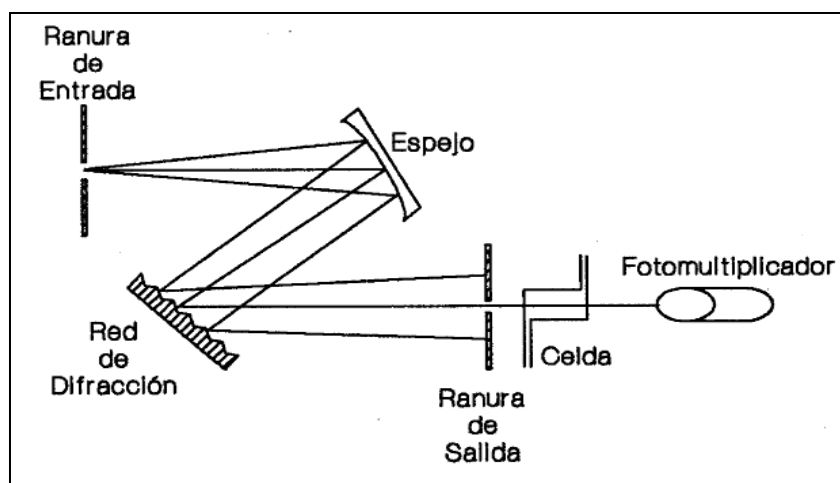


Figura 8. Detector de longitud de onda variable

Dentro de la detección UV existen dos tipos: de longitud onda fija y de longitud de onda variable, dentro de éste último se encuentra el detector UV con arreglo de fotodiodos; en éstos detectores se emplea un sistema óptico invertido, es decir, la celda se ilumina con luz no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y se dispersa hacia el elemento fotosensible (ver figura 8). En lugar de una fotocelda, se emplea un conjunto de fotoceldas o fotodiodos montados en un chip de silicio (ver figura 9), de esta forma, se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, si no todo el espectro de absorción del eluído en tiempo real. [Quattrocchi, 1992]

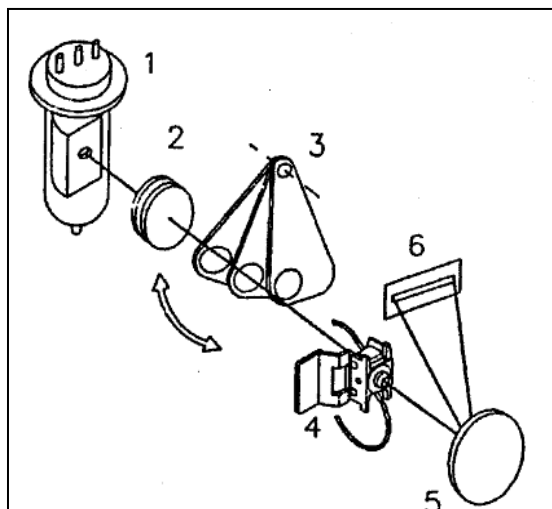


Figura 9. Detector con Arreglo de fotodiodos: 1) Lámpara de Deuterio, 2) Sistema de lentes (óptico), 3) Chopper, 4) Celda, 5) red de difracción y 6) ordenamiento de fotodiodos.

3.12 Validación del método

La medida de la concentración de una droga o sus metabolitos en matrices biológicas (como suero, plasma, sangre, orina y saliva) es un aspecto importante en el desarrollo de productos medicinales y en estudios clínicos. Los resultados pueden ser requeridos para soportar aplicaciones para nuevas sustancias activas y medicamentos genéricos, así como variaciones en los medicamentos autorizados. Los resultados de los estudios toxicocinéticos en animales y pruebas clínicas, incluyendo los estudios de bioequivalencia son usados para tomar decisiones críticas que soportan la seguridad y la eficiencia de un medicamento o un producto. Por esta razón es de suma importancia que los métodos bioanalíticos utilizados estén bien caracterizados, completamente validados y documentados, de manera satisfactoria con el fin de obtener resultados confiables.

El objetivo principal en una validación es demostrar la confiabilidad de un método particular para la determinación de un analito en una matriz biológica específica, como sangre, suero, plasma, orina o saliva. [EMA, 2012]

Según la ISO (Organización Internacional de Normalización, por sus siglas en inglés), la validación de un método es el proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones, la identificación de las influencias que pueden modificar esas características. La validación es un requisito importante en la práctica del análisis químico. [Eurachem, 2005]

Los parámetros fundamentales para asegurar la aceptabilidad y el desempeño de una validación de un método bioanalítico son la exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. [Gokani, 2004], [Rabbaa, 2006]

La comprensión sobre la validación del método se ve limitada por el hecho de que muchos términos técnicos utilizados en los procesos para evaluar métodos varían en los diferentes sectores de las mediciones analíticas, tanto en términos de su significado así como también en la forma en que son aplicados.

3.12.1 Selectividad

La selectividad de un método, también conocida como especificidad, determina exactamente y específicamente el analito en presencia de otros componentes en la matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidos.

La interferencia de otros compuestos en la medición del analito, dependerá de la efectividad de la etapa de separación y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición. La selectividad y la especificidad son medidas que garantizan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias.

3.12.2 Curva de Calibración

La relación entre la respuesta del instrumento y la concentración del analito se representa mediante la curva de calibración, ésta debe ser para cada analito en la muestra, para lo cual, se prepara en la misma matriz biológica de la muestra de interés.

3.12.3 Exactitud

Describe la cercanía de los resultados obtenidos por el método con el valor aceptado como verdadero. Se puede verificar la exactitud utilizando un material de referencia determinando la media y la desviación estándar de una serie de réplicas de una prueba y se compara contra el valor caracterizado del material de referencia, que idealmente sería un material de referencia certificado, de matriz natural, muy semejante a las muestras de interés. La disponibilidad de estos materiales es limitada. Otra forma sería adicionando cantidades conocidas del analito a la matriz de trabajo y a partir del porcentaje de recuperación determinar el valor medio y la desviación estándar en una serie de réplicas de una prueba.

3.12.4 Precisión

Mide el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes, obtenidos bajo condiciones estipuladas.

3.12.5 Recobro

Se refiere a la eficiencia de la extracción de un método analítico dentro de los límites de variabilidad. Se determina, comparando la señal debida a la concentración del analito, el cual se extrae de la matriz biológica y se compara con la señal de respuesta del analito puro (estándar).

Los métodos analíticos no siempre miden todo el analito presente en la muestra. Los analitos pueden estar presentes en una variedad de formas en las muestras de las cuales no todas son de interés para el analista. El método debe entonces diseñarse deliberadamente para determinar solamente una forma específica del analito.

3.12.6 Estabilidad de la Muestra

La estabilidad de un principio activo en un fluido biológico es en función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas, la matriz y sistema de contenedor de la muestra. [FDA, 2001]

3.12.7 Proceso de validación del método

En él está implícito que los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan usando instrumental analítico dentro de las especificaciones, que se encuentren funcionando correctamente y que estén calibrados adecuadamente. Asimismo, el químico analista que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio.

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Así, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método. [Eurachem, 2005]

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Validar un método analítico para la determinación de cotinina en orina humana por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección UV-Vis/DAD.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un método para la extracción y recuperación de cotinina adicionada a una muestra biológica de orina humana.
- Evaluar los parámetros de validación de un método analítico para cuantificar cotinina, utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección UV-Vis/DAD.
- Determinar cotinina en muestras de orina de fumadores.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Condiciones Cromatográficas.

La separación y determinación de cotinina se realizará en un cromatógrafo líquido, Accela High Speed de Thermo Scientific, con detección UV-Vis y arreglo de fotodiodos. La columna que se utilizará para la separación contendrá una fase estacionaria de octadecilsiloxano (C18), de 125 mm x 4 mm y un tamaño de partícula de 5 micrómetros (LiChroCART, Merck).

La fase móvil consistirá en una mezcla de búfer dihidrógeno fosfato de sodio (NaH_2PO_4) 0.01M y acetonitrilo, en proporción de 85:15 respectivamente, conteniendo además 10 mM de octanosulfato de sodio. Se utilizará un flujo de 1 mLmin^{-1} . La absorción en el detector se medirá a una longitud de onda de 254 nm. Se inyectarán 50 μL de muestra.

5.2 Extracción de cotinina.

Se tomará 5 mL de muestra biológica y se adicionarán 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano. Se agitará y someterá a un baño de ultrasonido por 15 minutos o más; el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos.

Posteriormente se recolectará la fase orgánica y se evaporará con la ayuda de un sistema de luz IR (Infrarrojo) hasta sequedad. El residuo se disolverá con 1500 μL de fase móvil.

Se inyectará a partir de la concentración más baja hasta la concentración más alta en el cromatógrafo, filtrando previamente a través de filtro (no mayor a 0.45 μm) para jeringa.

5.3 Validación del Método.

5.3.1 Selectividad.

Un analista preparará los blancos, estos consistirán en la matriz biológica de trabajo obtenida de seis fuentes diferentes entre hombres y mujeres.

Se mezclarán 5 mL de la muestra y 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano, se agitará y someterá a un baño de ultrasonido por 15 minutos o más, el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos.

Se recolectará la fase orgánica y se evaporará con ayuda de un sistema de luz IR hasta sequedad. El residuo se disolverá con 1500 μL de fase móvil y se inyectará en el cromatógrafo, filtrando previamente a través de filtro (no mayor a 0.45 μm) para jeringa. Este no deberá presentar ninguna señal o respuesta en el tiempo de retención de la cotinina en el cromatograma.

5.3.2 Efecto de Arrastre

Se comprobará inyectando un blanco, libre de cotinina, seguido de inyectar un estándar con la concentración más alta en la curva de calibración. La señal de recobro no deberá ser mayor en un 20% al límite de cuantificación.

5.3.3 Exactitud

La exactitud será evaluada, preparando 3 niveles de concentración, haciendo un mínimo de 5 determinaciones por nivel.

Preparación de solución de trabajo para 1000 ngmL⁻¹

Se preparará una solución de cotinina, para lo cual se pesará 10 mg y se disolverá en un matraz de 10 mL con metanol, obteniéndose una concentración de 1000 μgmL^{-1} . De la solución resultante se tomará 2.5 mL y se llevará hasta un volumen final de 10 mL con metanol, para una concentración de 250 μgmL^{-1} .

Se tomarán 1.2 mL de la solución de cotinina a 250 μgmL^{-1} y se llevarán a un volumen de 50 mL con metanol, para una concentración de 6 μgmL^{-1} . Finalmente se tomará de la solución resultante, 500 μL y se llevará a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica de trabajo, se obtendrá una concentración de 300 ngmL^{-1} .

Se tomarán 5 mL de la solución de trabajo de 300 ngmL^{-1} y se adicionarán 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano. Se agitará y se someterá a un baño de ultrasonido por 15 minutos o más, el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos.

Cuando las fases se hayan separado, se procederá a recolectar la fase orgánica y se evaporará con ayuda de un sistema de luz IR hasta sequedad. El residuo será redissuelto con 1500 μL de fase móvil.

Preparación de solución de trabajo para 2000 ngmL⁻¹

Se preparará una solución de cotinina, para lo cual se pesarán 10 mg y se disolverá en un matraz de 10 mL con metanol, para una concentración de 1000 μgmL^{-1} . De la solución resultante se tomarán 2.5 mL y se llevará hasta un volumen final de 10 mL con metanol, para una concentración de 250 μgmL^{-1} .

Se tomarán 1.2 mL de la solución de cotinina a 250 μgmL^{-1} y se llevará a un volumen de 25 mL con metanol, para una concentración de 12 μgmL^{-1} . Finalmente se tomará de la solución resultante, 500 μL y se llevará a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica de trabajo, se obtendrá una concentración de 600 ngmL^{-1} .

Se tomarán 5 mL de la solución de trabajo de 600 ngmL^{-1} y se adicionarán 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano. Se agitará y se someterá a un baño de ultrasonido por 15 minutos o más, el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos.

Cuando las fases se hayan separado, se procederá a recolectar la fase orgánica y se evaporará con ayuda de un sistema de luz IR hasta sequedad. El residuo será redisolto con 1500 μL de fase móvil.

Preparación de solución de trabajo para 3000 ngmL^{-1}

Se preparará una solución de cotinina, para lo cual se pesará 10 mg y se disolverá en un matraz de 10 mL con metanol, obteniéndose una concentración de $1000 \mu\text{gmL}^{-1}$. De la solución resultante se tomarán 2.5 mL y se lleva hasta un volumen final de 10 mL con metanol, para una concentración de $250 \mu\text{gmL}^{-1}$.

Se tomarán 1.8 mL de la solución de cotinina a $250 \mu\text{gmL}^{-1}$ y se llevará a un volumen de 25 mL con metanol, obteniéndose una concentración de $18 \mu\text{gmL}^{-1}$. Finalmente se tomará de la solución resultante, 500 μL y se llevará a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica de trabajo, se obtendrá una concentración de 900 ngmL^{-1} .

Se tomarán 5 mL de la solución de trabajo de 900 ngmL^{-1} y se adicionarán 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano. Se agitará y se someterá a un baño de ultrasonido por 15 minutos o más, el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos. Se dejará separar las fases.

Cuando las fases se hayan separado, se procederá a recolectar la fase orgánica y se evaporará con ayuda de un sistema de luz IR hasta sequedad. El residuo será redisolto con 1500 μL de fase móvil.

Se inyectará en el cromatógrafo filtrando previamente a través de filtro (no mayor a 0.45 μm) para jeringa, partiendo de la solución menos concentrada hasta la de mayor concentración. El valor medio no deberá ser mayor al 15% de diferencia al valor verdadero.

5.3.4 Precisión

La precisión será evaluada, preparando 3 niveles de concentración, haciendo un mínimo de 5 determinaciones por nivel de concentración.

Preparación de solución de trabajo para 1000 ngmL^{-1}

Se preparará una solución de cotinina, para lo cual se pesará 10 mg y se disolverá en un matraz de 10 mL con metanol, obteniéndose una concentración de $1000 \mu\text{gmL}^{-1}$. De la

solución resultante se tomará 2.5 mL y se llevará hasta un volumen final de 10 mL con metanol, para una concentración de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Se tomarán 1.2 mL de la solución de cotinina a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se llevarán a un volumen de 50 mL con metanol, para una concentración de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Finalmente se tomará de la solución resultante, 500 μL y se llevará a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica de trabajo, se obtendrá una concentración de 300 ng mL^{-1} .

Se tomarán 5 mL de la solución de trabajo de 300 ng mL^{-1} y se adicionarán 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano. Se agitará y se someterá a un baño de ultrasonido por 15 minutos o más, el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos. Se dejará separar las fases.

Cuando las fases se hayan separado, se procederá a recolectar la fase orgánica y se evaporará con ayuda de un sistema de luz IR hasta sequedad. El residuo será redissuelto con 1500 μL de fase móvil.

Preparación de solución de trabajo para 2000 ng mL^{-1}

Se preparará una solución de cotinina, para lo cual se pesarán 10 mg y se disolverá en un matraz de 10 mL con metanol, para una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. De la solución resultante se tomarán 2.5 mL y se llevará hasta un volumen final de 10 mL con metanol, para una concentración de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Se tomarán 1.2 mL de la solución de cotinina a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se llevará a un volumen de 25 mL con metanol, para una concentración de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$. Finalmente se tomará de la solución resultante, 500 μL y se llevará a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica de trabajo, se obtendrá una concentración de 600 ng mL^{-1} .

Se tomarán 5 mL de la solución de trabajo de 600 ng mL^{-1} y se adicionarán 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano. Se agitará y se someterá a un baño de ultrasonido por 15 minutos o más, el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos. Se dejará separar las fases.

Cuando las fases se hayan separado, se procederá a recolectar la fase orgánica y se evaporará con ayuda de un sistema de luz IR hasta sequedad. El residuo será redissuelto con 1500 μL de fase móvil.

Preparación de solución de trabajo para 3000 ng mL^{-1}

Se preparará una solución de cotinina, para lo cual se pesará 10 mg y se disolverá en un matraz de 10 mL con metanol, obteniéndose una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. De la solución resultante se tomarán 2.5 mL y se lleva hasta un volumen final de 10 mL con metanol, para una concentración de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Se tomarán 1.8 mL de la solución de cotinina a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se llevará a un volumen de 25 mL con metanol, obteniéndose una concentración de $18 \mu\text{g mL}^{-1}$. Finalmente se tomará de la solución resultante, 500 μL y se llevará a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica de trabajo, se obtendrá una concentración de 900 ng mL^{-1} .

Se tomarán 5 mL de la solución de trabajo de 900 ng mL^{-1} y se adicionarán 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano. Se agitará y se someterá a un baño de ultrasonido por 15 minutos o más, el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos. Se dejará separar las fases.

Cuando las fases se hayan separado, se procederá a recolectar la fase orgánica y se evaporará con ayuda de un sistema de luz IR hasta sequedad. El residuo será redissuelto con 1500 μL de fase móvil.

Se inyectará en el cromatógrafo, filtrando previamente a través de filtro (no mayor a 0.45 μm) para jeringa, partiendo de la solución menos concentrada hasta la de mayor concentración. El coeficiente de variación, en cada nivel de concentración, no deberá ser mayor al 15%. El procedimiento se llevará a cabo por dos analistas.

5.3.5 Límite de Cuantificación

Preparación de solución de trabajo a 100 ng mL^{-1}

Se preparará una solución de cotinina, para lo cual se pesará 10 mg y se disolverá en un matraz de 10 mL con metanol, obteniéndose una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. De la solución resultante se tomará 2.5 mL y se llevará hasta un volumen final de 10 mL con metanol, para una concentración de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Se tomarán 1.2 mL de la solución de cotinina a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se llevarán a un volumen de 25 mL con metanol, obteniéndose una concentración de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$. De ésta solución se tomará una alícuota de 1.25 mL y se llevará a un volumen de 25 mL con metanol, obteniéndose una concentración de $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Finalmente, se tomará de la solución resultante, 1.6 μL y se diluirá a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica de trabajo. Se obtendrá una concentración de 100 ng mL^{-1} .

Extracción de la cotinina de la matriz biológica

Se tomarán 5 mL de la solución de trabajo de 100 ng mL^{-1} y se adicionarán 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano. Se agitará y se someterá a un baño de ultrasonido por 15 minutos o más, el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos, se dejará separar las fases.

Cuando las fases se hayan separado, se procederá a recolectar la fase orgánica y se evaporará con ayuda de un sistema de luz IR hasta sequedad. El residuo será redisolto con 1500 μL de fase móvil. Se inyectará en el cromatógrafo filtrando previamente a través de filtro (no mayor a 0.45 μm) para jeringa.

El coeficiente de variación (precisión) no deberá ser mayor al 20% y un recobro (exactitud) entre el 80 y 120% es aceptado.

5.3.6 Curva de Calibración

Se preparará una curva de calibración, diluyendo con muestra biológica. Para la curva se preparará por triplicado ocho niveles de concentración (100.0, 300.0, 1000.0, 2000.0, 2500.0, 3000.0, 4000.0, 6000.0 y 8000.0 ngmL^{-1}); a partir de 9 soluciones madre de 1000 μgmL^{-1} en metanol, preparadas pesando para cada una, 10 mg de cotinina y se disolverán en los matraces respectivos de 10 mL con metanol, obteniéndose una concentración de 1000 μgmL^{-1} y de estas soluciones se tomarán 2.5 mL y se diluirán hasta un volumen final de 10 mL con metanol, para una concentración de 250 μgmL^{-1} .

A partir de las soluciones de 250 μgmL^{-1} se prepararán tres soluciones a una concentración de 12 μgmL^{-1} , tomando volúmenes individuales de 1.2 mL y diluyendo con metanol hasta 25 mL. De las cinco soluciones de 250 μgmL^{-1} restantes, se tomarán por separado, volúmenes de 1.2 mL, 1.5 mL, 1.8 mL, 2.4 mL, 3.6 mL y 4.8 mL y diluyendo la primera en un matraz de 50 mL y las siguientes en matraces de 25 mL con metanol, las concentraciones serán de 6, 12, 15, 18, 24, 36 y 48 μgmL^{-1} .

Posteriormente se prepararán soluciones de 0.6 μgmL^{-1} , para lo cual se tomarán 1.2 mL de las primeras dos soluciones de 12 μgmL^{-1} y se diluirá a un volumen de 25 mL con metanol. La otra solución de 1.8 μgmL^{-1} se preparará, tomando 1.5 mL de la tercera solución de 12 μgmL^{-1} y finalmente se diluirá a 10 mL con metanol.

Se obtendrán entonces, soluciones de 0.6, 1.8, 6.0, 12.0, 15.0, 18.0, 24.0, 36.0 y 48.0 μgmL^{-1} .

De cada una de las soluciones anteriores, se tomarán volúmenes de 5 mL y se llevarán a volúmenes de 10 mL en matraces volumétricos, con muestra biológica libre de cotinina; se obtendrán soluciones de 30, 90, 300.0, 600.0, 750.0, 900.0, 1200.0, 1800.0 y 2400.0 ngmL^{-1} .

Extracción de la cotinina de la matriz biológica

Se tomarán 5 mL de la solución de cada trabajo y se adicionarán 750 μL de NaOH 1M y luego 5 mL de diclorometano. Se agitará y se someterá a un baño de ultrasonido por no

menos de 15 minutos, el contenido se trasladará inmediatamente a una centrifuga durante 10 minutos. Se dejará separar las fases.

Cuando las fases se hayan separado, se procederá a recolectar la fase orgánica y se evaporará con ayuda de un sistema de luz IR hasta sequedad. El residuo será redissuelto con 1500 μL de fase móvil, se obtendrán soluciones de 100.0, 300.0, 1000.0, 2000.0, 2500.0, 3000.0, 4000.0, 6000.0 y 8000 ngmL^{-1} .

Se inyectará en el cromatógrafo, filtrando previamente a través de filtro (de poro no mayor a 0.45 μm) para jeringa, partiendo de la solución menos concentrada hasta la de mayor concentración.

5.3.7 Recobro

Éste será determinado, comparando la señal debida a la concentración del analito extraído de la matriz biológica, en comparación con la respuesta del analito puro. El porcentaje de recobro no necesariamente será el 100%, pero deberá ser preciso, consistente y reproducible.

5.3.8 Estabilidad de la muestra

La estabilidad del analito se evaluará durante la recolección y manipulación de la muestra, a largo y corto plazo. Para las determinaciones, se utilizará una serie de muestras a partir de una solución madre, de preparación reciente, del analito en la matriz biológica libre de cotinina, éstas serán preparadas y extraídas hasta obtener dos soluciones de trabajo: 1000 ngmL^{-1} y 3000 ngmL^{-1} .

Estabilidad al congelar y descongelar

La estabilidad será determinada después de tres ciclos de congelación y descongelación. Al menos tres alícuotas a cada una de las concentraciones (1000 y 3000 ngmL^{-1}) serán almacenadas a cero grados centígrados (0 °C) durante 24 horas y se descongelarán a temperatura ambiente. Cuando se encuentren completamente descongeladas, las muestras se volverán a congelar durante 12 a 24 horas en las mismas condiciones. El ciclo de congelación-descongelación se repetirá dos veces más y serán analizadas en el tercer ciclo.

Si un analito es inestable a la temperatura de almacenamiento deseada, la prueba de estabilidad se deberá realizar congelando la muestra a -70 °C durante los tres ciclos de congelación y descongelación.

Estabilidad de temperatura a corto plazo

Tres alícuotas de cada una de las concentraciones de 1000 y 3000 ngmL^{-1} serán descongeladas a temperatura ambiente y se mantendrán a esta temperatura entre 4 a 24 horas y luego se analizarán.

Estabilidad a largo plazo

El tiempo de almacenamiento en la evaluación de la estabilidad a largo plazo deberá exceder el tiempo transcurrido entre la fecha de la primera recolección de muestras y la fecha del último análisis de la muestra. La estabilidad a largo plazo será determinada comparando la señal de tres alícuotas de cada una de las concentraciones de 1000 ngmL^{-1} y 3000 ngmL^{-1} , en las mismas condiciones que las muestras de estudio. El volumen de las muestras deberá ser suficiente para el análisis en tres ocasiones distintas. Las concentraciones de todas las muestras sometidas a la prueba de estabilidad deberán ser comparadas con la media de los valores calculados con los estándares en las concentraciones adecuadas desde el primer día de las pruebas de estabilidad a largo plazo.

Estabilidad de las soluciones de trabajo

La estabilidad de las soluciones de trabajo y del estándar, serán evaluadas a temperatura ambiente luego de seis horas, tiempo después del cual se comparará la condición de estabilidad de ambas disoluciones.

Estabilidad post-preparativa

Se determinará la estabilidad de las muestras procesadas, incluyendo el tiempo de residencia en el muestreador automático. La estabilidad de la muestra y el estándar será evaluada sobre el tiempo de funcionamiento previsto (tiempo que dura el análisis).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Materiales, reactivos y equipo de laboratorio

Materiales:

- Matraces de vidrio de 10 mL
- Matraces de vidrio de 25 mL
- Matraces de vidrio de 50 mL
- Matraces de vidrio de 100 mL
- Embudos
- Pipetas Pasteur
- Puntas para micropipeta de 1000 μ L
- Puntas para micropipeta de 5000 μ L
- Beakers de 50 mL
- Beakers de 100 mL
- Beakers de 1000 mL
- Probeta de 1000 mL
- Magneto agitador
- Tubos de ensayo
- Viales de vidrio con rosca, de 1.8 mL
- Jeringas de 10 mL
- Filtros de nylon para jeringa, con poro de 0.22 μ m
- Microespátula
- Rendija para tubos de ensayo

Reactivos:

- Acetonitrilo calidad HPLC, Mallinckrodt - Baker
- Metanol calidad HPLC, Mallinckrodt – Baker
- Agua desmineralizada
- Agua calidad HPLC
- Trietilamina AR, Merck
- Ácido Fosfórico 85% AR, Merck
- Diclorometano AR, , Mallinckrodt – Baker
- Hidróxido de Sodio AR, , Mallinckrodt – Baker
- Fosfato de potasio monobásico, , Mallinckrodt – Baker

Equipo:

- Cromatógrafo Líquido Ultra-Rápido, UHPLC, *Accela High Speed*, Thermo Scientific
- Conductivímetro, Mettler-Toledo
- pH Meter, Mettler-Toledo
- Ultrasonido, Ney
- Centrifuga,
- Balanza Analítica, Mettler-Toledo

- Balanza Semi analítica, Mettler-Toledo
- Hot Plate con placa agitadora, Thermo Scientific
- Cámara extractora de gases
- Lámpara IR
- Micropipeta de 5000 μL , Brand
- Micropipeta de 1000 μL , Brand

6.2 Muestra

Las muestras biológicas utilizadas en la validación del método se obtuvieron a partir de 6 voluntarios sanos, no fumadores y que no frecuentan ambientes con humo de cigarrillo.

Los voluntarios fueron 3 hombres y 3 mujeres con edades entre los 19 y 49 años, quienes manifestaron no estar bajo ningún tratamiento médico o consumiendo medicamentos. Como parte del experimento, se solicitó a los voluntarios tomar al menos dos litros de agua un día anterior a la toma de la muestra, con la finalidad de provocar diuresis y poder recolectar fácilmente la muestra de orina en las primeras horas del día.

Para la determinación de cotinina en fumadores (activos y pasivos), los participantes debían de mantener su rutina con el cigarrillo, además se seleccionó una persona con hábitos de fumar diariamente (fumador activo) y una persona, del mismo núcleo familiar que no fumara, pero que ésta permaneciera cercana al ambiente de fumadores y al humo de tabaco de forma rutinaria (fumador pasivo). Ambos voluntarios eran sanos y no consumían medicamentos, antes y durante el experimento (ver tabla 3).

Tabla 3. Características generales de los voluntarios.

Sexo	Identificación	Edad	Peso (lb)	No fumador	Fumador Activo	Fumador Pasivo
Femenino	VST	28 años	135	✓		
Masculino	RAS	19 años	130	✓		
Masculino	HDS	28 años	135	✓		
Femenino	DMT	43 años	126	✓		
Femenino	FMS	49 años	136	✓		
Masculino	LAU	24 años	118	✓		
Masculino	LGN	27 años	152			✓
Masculino	EJN	33 años	240		✓	

Las muestras fueron recolectadas en las primeras horas de la mañana.

6.3 Optimización de las condiciones cromatográficas

Se prepararon una serie de soluciones las cuales serían utilizadas como fase móvil y diluyentes para la determinación y separación de la cotinina por HPLC.

Condición 1:

La fase móvil utilizada fue una solución búffer formada por una mezcla entre $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01M y Acetonitrilo, en las proporciones 425:75, conteniendo además 2.16 mg de Octanosulfonato de Sodio por cada mililitro, utilizándose como diluyente final la misma fase móvil.

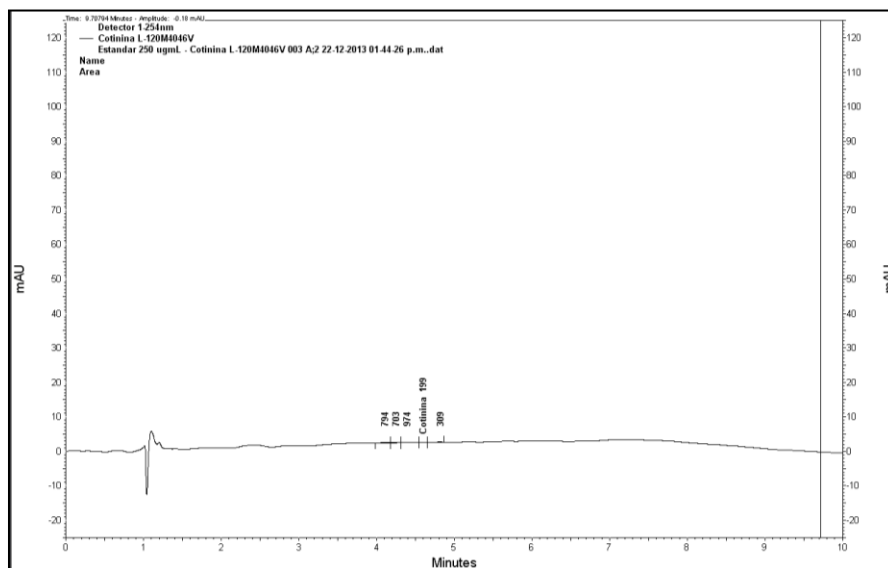


Figura 10. Condición 1

Condición 2:

Se preparó un búffer a partir una solución que contenía 136.0 mg g de KH_2PO_4 y 100.0 mg de Octanosulfonato de sodio disuelto en 410 mL de agua y mezclándola con 90 mL de metanol.

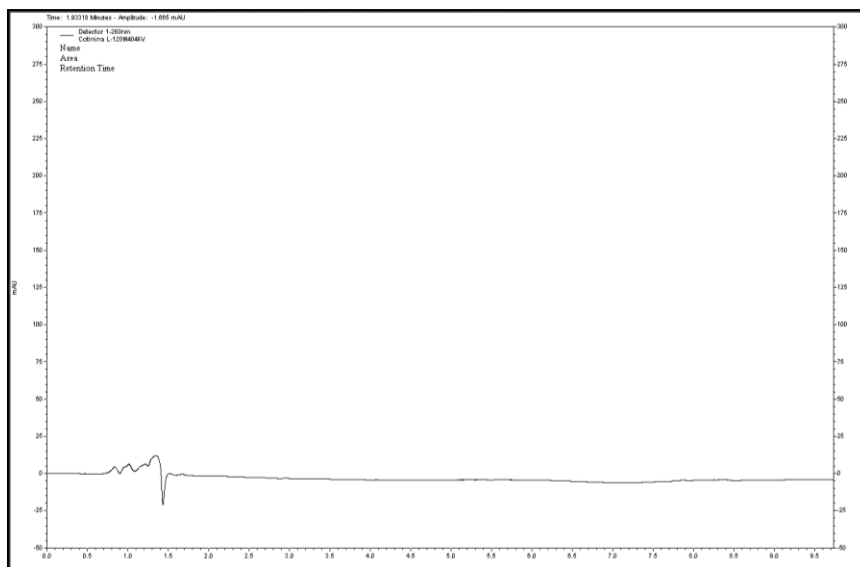


Figura 11. Condición 2

Condición 3:

Se preparó una solución búffer mezclando 80 volúmenes fosfato de potasio monobásico a 0.01M, ajustado a pH 6.8 con NaOH 1N y 20 volúmenes de Acetonitrilo.

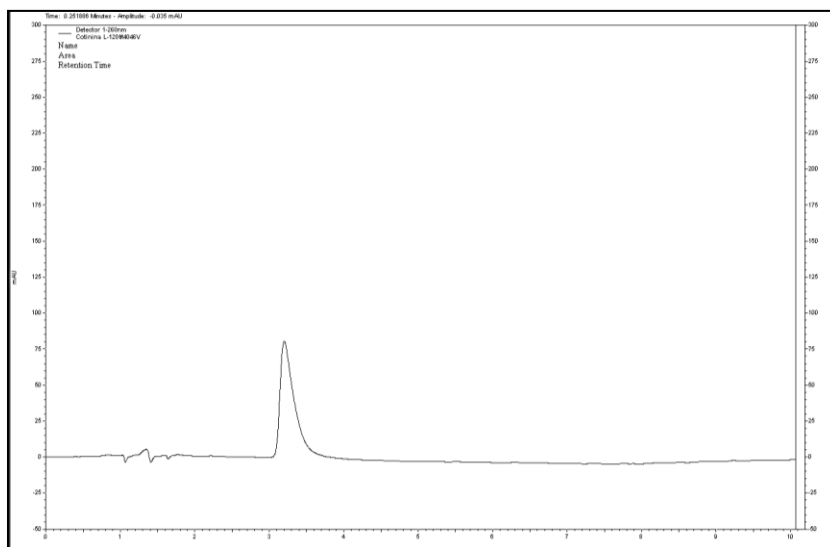


Figura 12. Condición 3

Condición 4:

Se preparó una solución que contenía 23 volúmenes de Acetonitrilo con 77 volúmenes de Trietilamina al 0.1% en agua, ajustando el pH de la mezcla con H₃PO₄ al 85% hasta un valor de 8.7 ± 0.05 , la cual fue utilizada como fase móvil; y se utilizó como diluyente una mezcla de 90 volúmenes de fosfato de potasio monobásico al 0.01M, ajustado a pH 6.8 con NaOH 1N, con 10 volúmenes de Acetonitrilo.

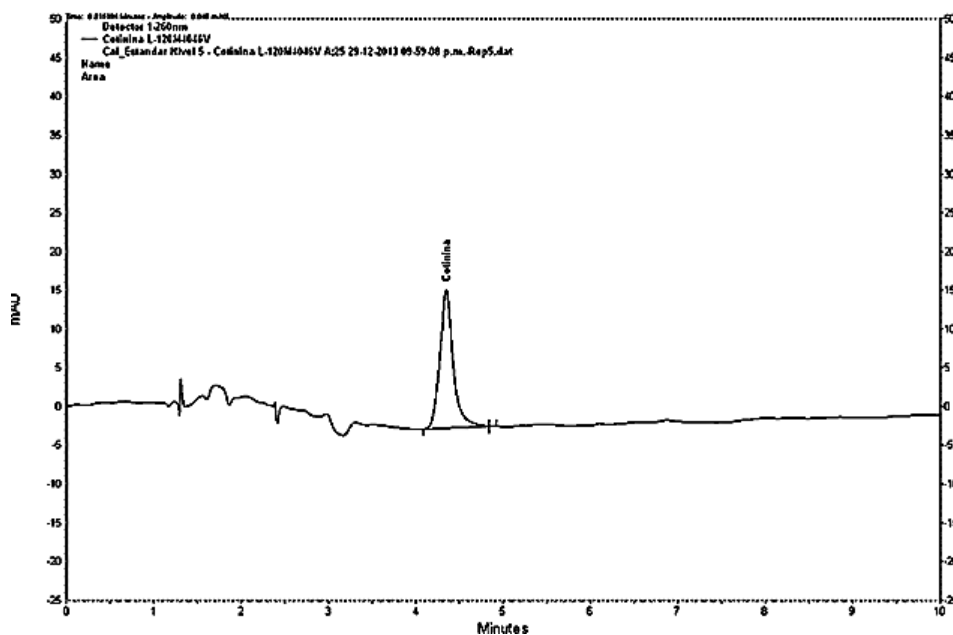


Figura 13. Condición 4

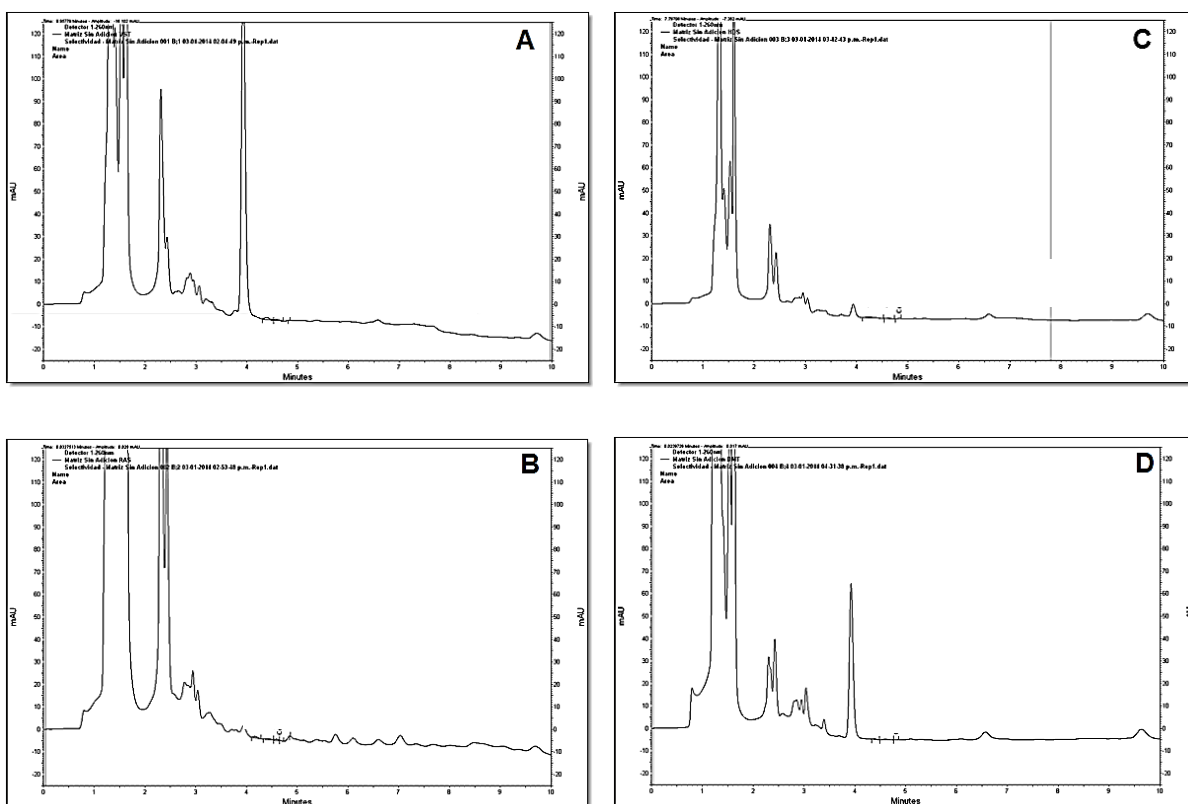
Como nos podemos dar cuenta las dos primeras condiciones presentan señales muy débiles o no presentan señal en los tiempos en los que se espera que aparezca la cotinina. La tercer condición presenta la señal debida a la cotinina, pero esta es poco definida. Se decidió utilizar la condición número 4, la cual presenta la señal de la cotinina muy definida a un tiempo de retención entre los 4 y los 4.5 minutos.

6.4 Validación del método analítico

6.4.1 Selectividad

A partir de seis fuentes diferentes, entre hombres y mujeres con un rango de edad de los 19 a 49 años, se preparó de manera independiente, un blanco con la matriz de trabajo, para lo cual se tomaron 5 mL de cada matriz y se agregó a cada una de ellas 750 μ L de NaOH 1M y se agitaron, luego se agregó a cada una 5 mL de diclorometano, se agitó y se sometió al ultrasonido por un intervalo de 15 minutos, evitando el calentamiento. Luego de haber sido sonificadas, se trasladaron a tubos de ensayo para ser centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos para separar las fases.

La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se evaporó hasta sequedad con ayuda de radiación infrarroja emitida por una lámpara IR de 250W. El Residuo se disolvió con 1500 μ L de diluyente y se filtró a través de un filtro para jeringa de 0.22 μ m de nylon, y se trasladó a un vial de 1.8 mL para ser inyectada en el cromatógrafo.



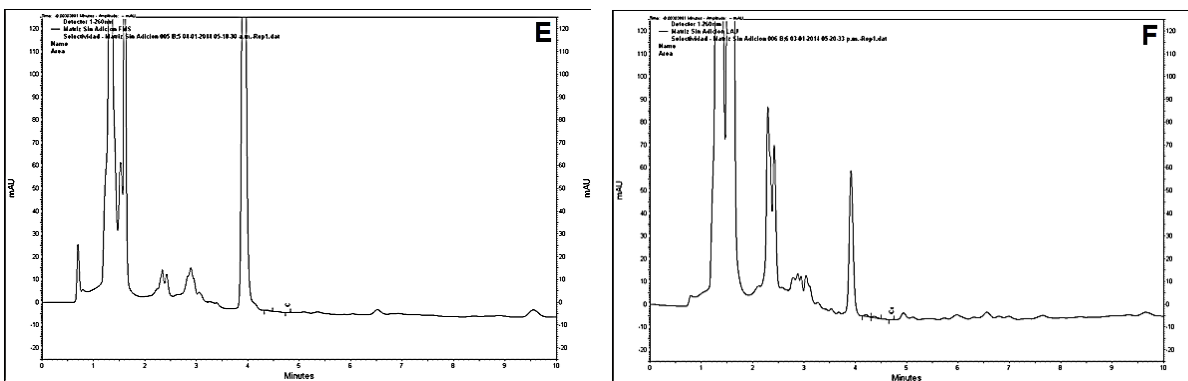


Figura 14 Cromatogramas correspondientes a la prueba de Selectividad.
 A: muestra del voluntario VST, B: muestra del voluntario RAS, C: muestra del voluntario HDS, D muestra del voluntario DMT, E: muestra del voluntario FMS y F: muestra del voluntario LAU.

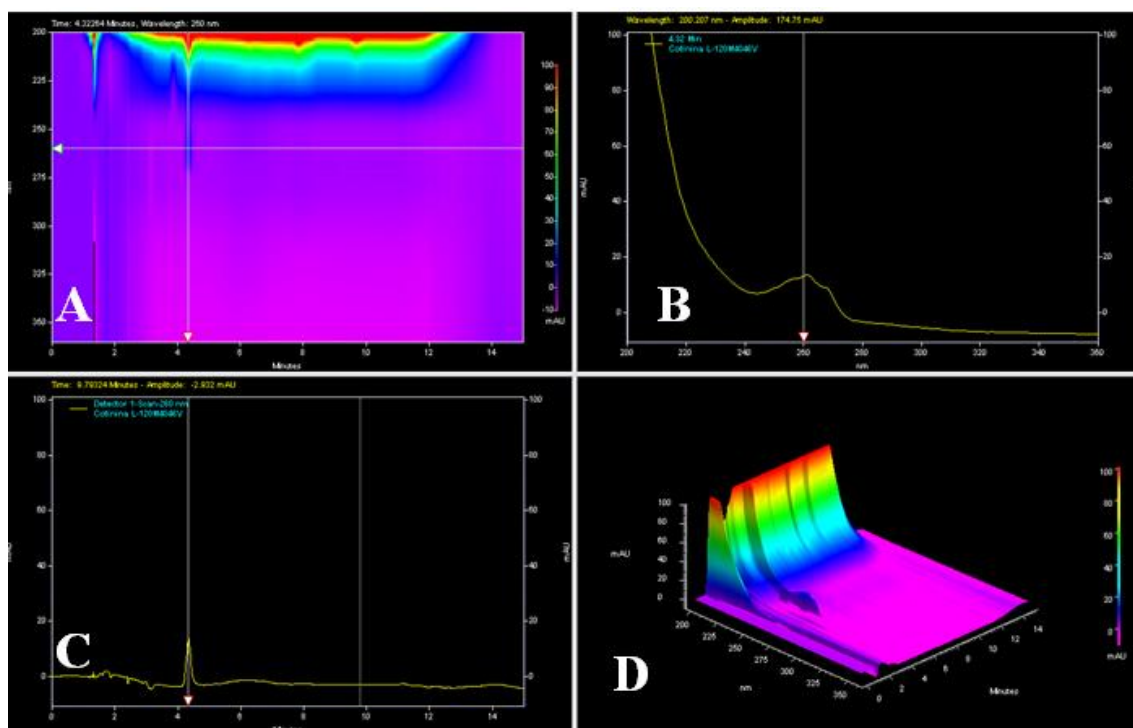


Figura 15. Vista general del Detector de Arreglo de Foto Diodos (PDA)
 A: vista aérea del espectro UV-Vis vs Tiempo; B: espectro ultra violeta correspondiente al pico cromatográfico de interés (cotinina); C: Cromatograma correspondiente a la señal de la cotinina; D: Grafico tridimensional el cual combina A, B y C.

El Criterio para selectividad indica que “No debe haber señal debida al analito o debe ser menor al 20%” esto quiere decir que en el tiempo de retención de la cotinina entre 4 y 4.5 minutos no debe haber ninguna señal.

Al observar cada uno de los cromatogramas en el rango de los 4 a 4.5 minutos ninguno de ellos presenta señal debida a la cotinina, esto nos indica que el método es selectivo para el analito cotinina, las demás señales que se encuentran en los cromatogramas son debidas a todas aquellas sustancias que desecha el cuerpo mediante la orina.

6.4.2 Efecto de Arrastre

Seguido de inyectar la concentración más alta de la curva de calibración, se inyectó un blanco libre de cotinina.

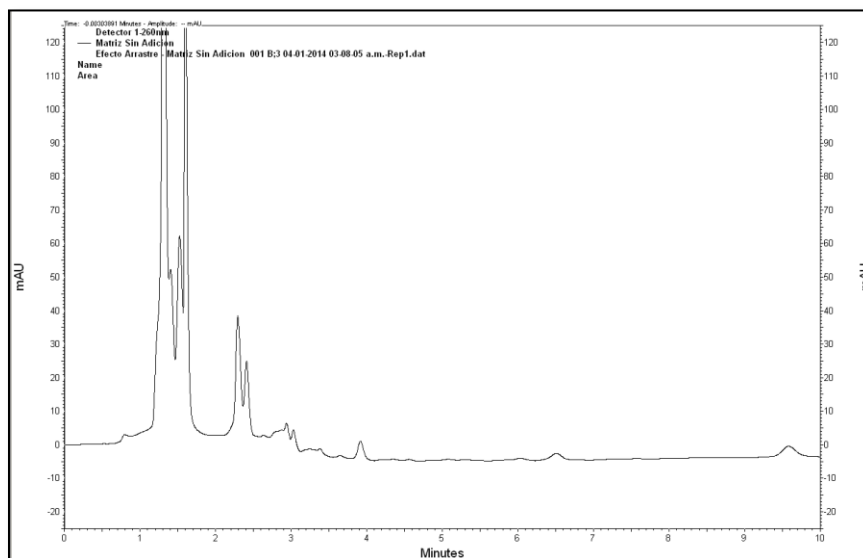


Figura 16. Cromatograma correspondiente a prueba de Efecto Arrastre.

Este parámetro es útil para verificar que no exista ningún residuo en el inyector que genere una suma de señales que afecten la lectura de las mismas. El criterio de la FDA para este parámetro establece que “La señal obtenida no deberá ser mayor al 20% del límite de cuantificación”. Al observar la figura 15 entre los minutos 4 y 4.5 no se observa señal debida a cotinina, lo cual indica que el parámetro es superado.

6.4.3 Exactitud

Se prepararon tres niveles de concentración a 1000, 2000 y 3000 ngmL^{-1} utilizando la matriz biológica.

Solución de trabajo a 1000 ngmL^{-1}

Se preparó una solución madre de cotinina en metanol con una concentración de 1000 μgmL^{-1} ; a partir de ésta y haciendo las diluciones necesarias, se obtuvo una concentración de 6 μgmL^{-1} en metanol; se tomaron 500 μL de la solución resultante y se diluyó a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica, obteniéndose una concentración de 300 ngmL^{-1} .

Se tomaron 5 mL de la solución, se adiciono 750 μL de NaOH 1M y se mezcló, seguidamente se agregaron 5 mL de diclorometano, se agitó y se sometió a un baño ultrasónico por un intervalo de 15 minutos, evitando el calentamiento. Luego de haber sido sonificada, la solución se trasladó a un tubo de ensayo para ser centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos para separar las fases.

La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se evaporó hasta sequedad con ayuda de la radiación infrarroja emitida por una lámpara IR de 250W. El Residuo se disolvió con 1500 μL de diluyente y se filtró a través de un filtro para jeringa de 0.22 μm de nylon, y se trasladó a un vial de 1.8 mL para ser inyectado en el cromatógrafo.

Tabla 4a. Resultados para el nivel de concentración 1000 ngmL^{-1}

Concentración (ngmL^{-1})	Área	Promedio	S	RSD	Concent. Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
1000	64749	63392.80	1195.59	1.89	919.19	91.92	89.99	1.70	1.89
1000	63842				906.32	90.63			
1000	62012				880.34	88.03			
1000	62264				883.92	88.39			
1000	64097				909.94	90.99			

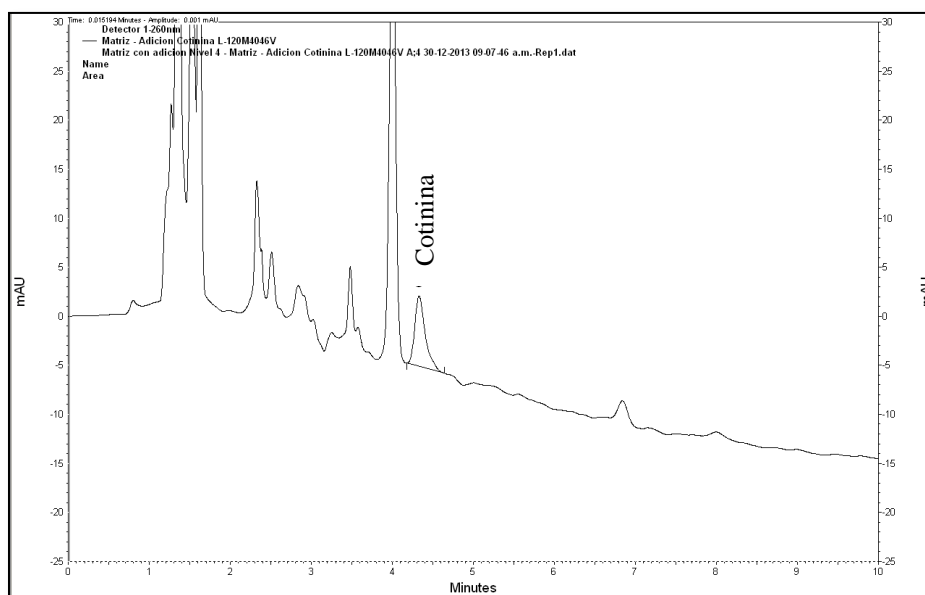


Figura 17. Cromatograma correspondiente al parámetro de Exactitud a 1000 ngmL^{-1}

Solución de trabajo a 2000 ngmL^{-1}

Se preparó una solución madre de cotinina en metanol con una concentración de 1000 μgmL^{-1} . A partir de la solución anterior, haciendo las diluciones necesarias se obtuvo una concentración de 12 μgmL^{-1} en metanol; se tomaron entonces 500 μL de la solución

resultante y se diluyeron a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica, obteniéndose una concentración de 600 ngmL⁻¹.

Se tomaron 5 mL de la solución, se adicionó 750 µL de NaOH 1M y se mezcló, seguidamente se agregaron 5 mL de diclorometano, se agitó y se sometió a un baño ultrasónico por 15 minutos, evitando el calentamiento. Luego de haber sido sonificada, la solución se trasladó a un tubo de ensayo para ser centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos, para separar las fases.

La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se evaporó hasta sequedad con ayuda de la radiación infrarroja emitida por una lámpara IR de 250W. El Residuo se disolvió con 1500 µL de diluyente y se filtró a través de un filtro para jeringa de 0.22 µm de nylon, y se trasladó a un vial de 1.8 mL para ser inyectado en el cromatógrafo.

Tabla 4b. Resultados para el nivel de concentración 2000 ngmL⁻¹

Concentración (ngmL ⁻¹)	Área	Promedio	S	RSD	Concent. Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
2000	122878	123581.20	3458.64	2.80	1744.41	87.22	87.72	2.45	2.80
2000	127135				1804.84	90.24			
2000	118210				1678.14	83.91			
2000	126003				1788.77	89.44			
2000	123680				1755.79	87.79			

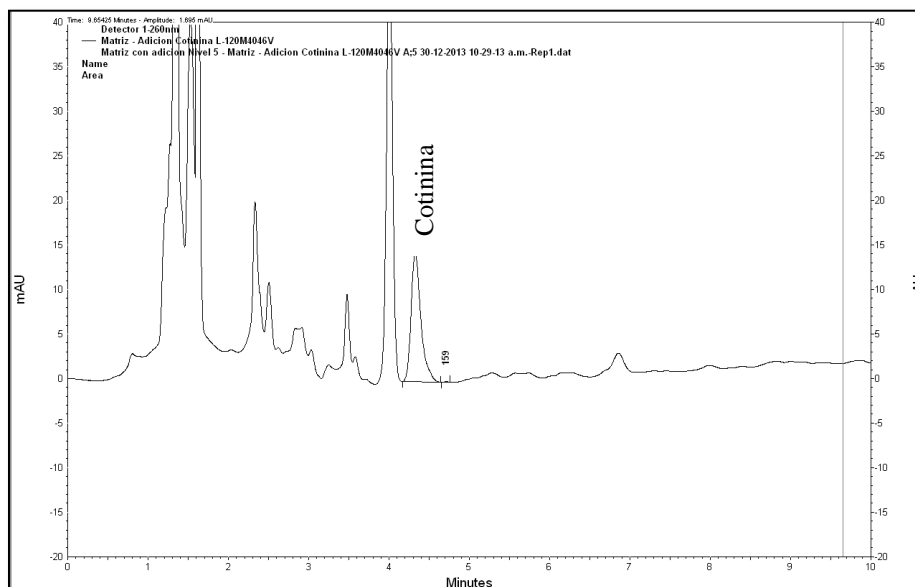


Figura 18. Cromatograma correspondiente al parámetro de Exactitud a 2000 ngmL⁻¹

Solución de trabajo a 3000 ngmL⁻¹

Se preparó una solución madre de cotinina en metanol con una concentración de 1000 µgmL⁻¹; a partir de ésta solución, haciendo las diluciones necesarias se obtuvo una concentración de 18 µgmL⁻¹ en metanol; se tomaron entonces 500 µL de la solución

resultante y se diluyeron a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica, obteniéndose una concentración de 900 ngmL⁻¹.

Se tomaron 5 mL de la solución, se adicionó 750 µL de NaOH 1M y se mezcló, seguidamente se agregaron 5 mL de diclorometano, se agitó y se sometió a un baño ultrasónico por un intervalo de 15 minutos, evitando el calentamiento. Luego de haber sido sonificada, la solución se trasladó a un tubo de ensayo para ser centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos para separar las fases.

La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se evaporó hasta sequedad con ayuda de la radiación infrarroja emitida por una lámpara IR de 250W. El Residuo se disolvió con 1500 µL de diluyente y se filtró a través de un filtro para jeringa de 0.22 µm de nylon, y se trasladó a un vial de 1.8 mL para ser inyectado en el cromatógrafo.

Tabla 4c. Resultados para el nivel de concentración 3000 ngmL⁻¹

Concentración (ngmL ⁻¹)	Área	Promedio	S	RSD	Concent. Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
3000	199173	198474.80	933.23	0.47	2827.51	94.25	93.92	0.44	0.47
3000	198615				2819.59	93.99			
3000	197393				2802.24	93.41			
3000	199539				2832.71	94.42			
3000	197654				2805.95	93.53			

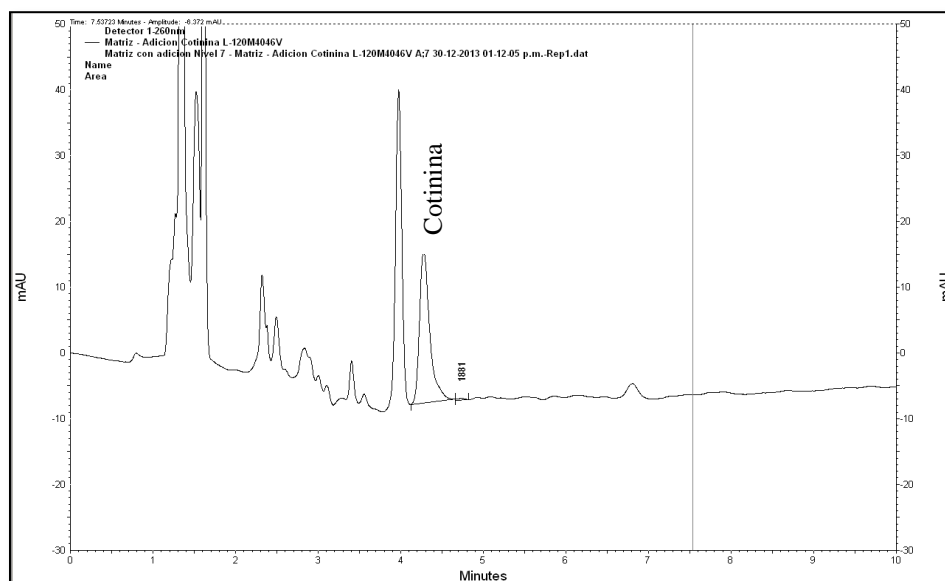


Figura 19. Cromatograma correspondiente al parámetro de Exactitud a 3000ngmL⁻¹

Con la exactitud verificamos que los resultados obtenidos se encuentren cercanos al valor aceptado como verdadero, para este parámetro la FDA indica que: “El valor medio debe estar dentro del 15% del valor real, excepto en el límite de cuantificación (LDC) donde no debe diferir en más de un 20%.”

El valor promedio obtenido experimentalmente para cada uno de los niveles de concentración se encuentran dentro de los límites ($\pm 15\%$) respecto al valor tomado como verdadero, obteniéndose una desviación máxima de 12.28% y una mínima de 6.08% con respecto a la media, en base a estos resultados el método es exacto.

6.4.4 Precisión

A partir de tres niveles de concentración se determina la precisión del método, utilizando como variable los analistas y el tiempo:

Solución de trabajo a 1000 ngmL⁻¹

Se preparó una solución madre de cotinina en metanol con una concentración de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; a partir de ésta solución, haciendo las diluciones necesarias se obtuvo una concentración de 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol; se tomaron entonces 500 μL de la solución resultante y se diluyeron a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica, obteniéndose una concentración de 300 ng mL^{-1} .

Se tomaron 5 mL de la solución, se adicionaron 750 μL de NaOH 1M y se mezcló, seguidamente se agregaron 5 mL de diclorometano, se agitó y se sometió a un baño ultrasónico por un intervalo de 15 minutos, evitando el calentamiento. Luego de haber sido sonificada, la solución se trasladó a un tubo de ensayo para ser centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos para separar las fases. La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se evaporó hasta sequedad con ayuda de la radiación infrarroja emitida por una lámpara IR de 250W. El Residuo se disolvió con 1500 μL de diluyente y se filtró a través de un filtro para jeringa de 0.22 μm de nylon, y se trasladó a un vial de 1.8 mL para ser inyectado en el cromatógrafo.

Tabla 5a. Resultados para el nivel de concentración 1000 ngmL⁻¹

	Concentración (ngmL ⁻¹)	Área	Promedio	S	RSD	Concentr Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
Analista 1	1000	64749	63392.80	1195.59	1.89	919.19	91.92	89.99	1.70	1.89
	1000	63842				906.32	90.63			
	1000	62012				880.34	88.03			
	1000	62264				883.92	88.39			
	1000	64097				909.94	90.99			
Analista 2	1000	60494	60040.00	1015.99	1.69	869.30	86.93	86.28	1.46	1.69
	1000	60279				866.21	86.62			
	1000	58245				836.99	83.70			
	1000	60456				868.76	86.88			
	1000	60726				872.64	87.26			
							Media GLOBAL	88.14		
							S (GLOBAL)	2.46		
							RSD (GLOBAL)	2.79		

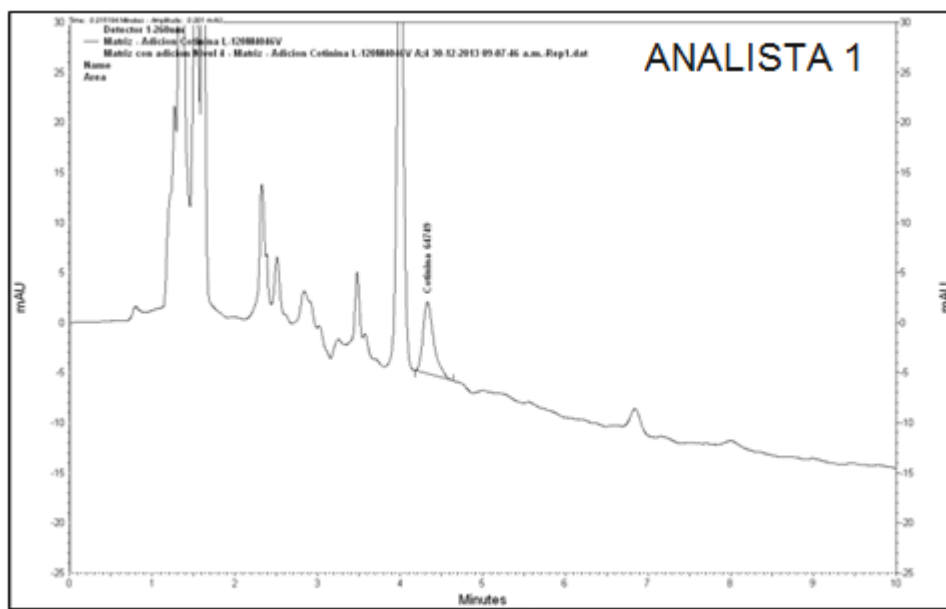


Figura 20. Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 1000ngmL^{-1} por Analista 1

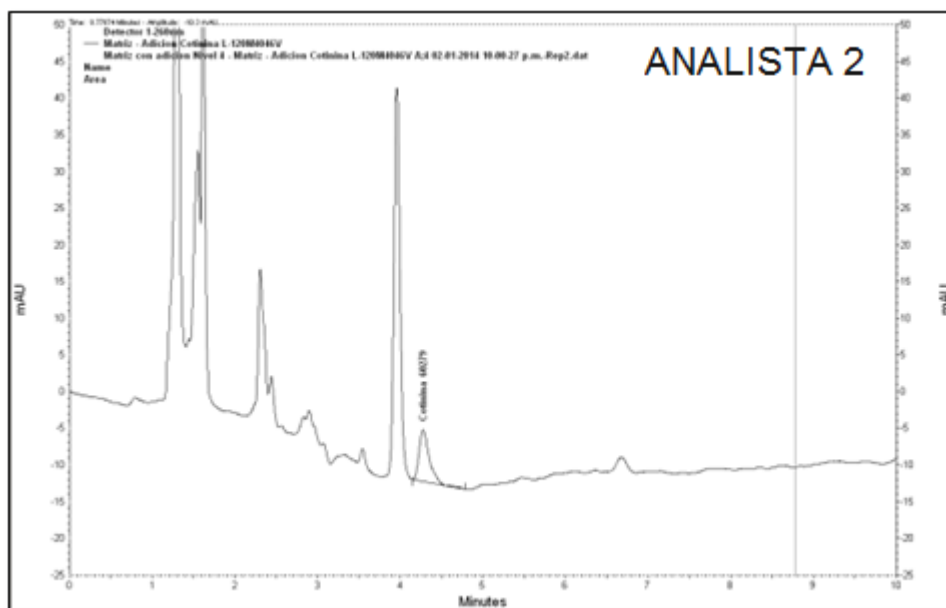


Figura 21. Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 1000ngmL^{-1} por Analista 2

Solución de trabajo a 2000 ngmL⁻¹

Se preparó una solución madre de cotinina en metanol con una concentración de 1000 µgmL⁻¹; a partir de ésta solución, haciendo las diluciones necesarias se obtuvo una concentración de 12 µgmL⁻¹ en metanol; se tomaron entonces 500 µL de la solución resultante y se diluyeron a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica, obteniéndose una concentración de 600 ngmL⁻¹.

Se tomaron 5 mL de la solución, se adicionaron 750 µL de NaOH 1M y se mezcló, seguidamente se agregaron 5 mL de diclorometano, se agitó y se sometió a un baño ultrasónico por un intervalo de 15 minutos, evitando el calentamiento. Luego de haber sido sonificada, la solución se trasladó a un tubo de ensayo para ser centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos para separar las fases.

La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se evaporó hasta sequedad con ayuda de la radiación infrarroja emitida por una lámpara IR de 250W. El Residuo se disolvió con 1500 µL de diluyente y se filtró a través de un filtro para jeringa de 0.22 µm de nylon, y se trasladó a un vial de 1.8 mL para ser inyectado en el cromatógrafo.

Tabla 5b. Resultados para el nivel de concentración 2000 ngmL⁻¹

	Concentración (ngmL ⁻¹)	Área	Promedio	S	RSD	Concentr Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
Analista 1	2000	122878	123581.20	3458.64	2.80	1744.41	87.22	87.72	2.45	2.80
	2000	127135				1804.84	90.24			
	2000	118210				1678.14	83.91			
	2000	126003				1788.77	89.44			
	2000	123680				1755.79	87.79			
Analista 2	2000	122103	119960.80	1553.05	1.29	1754.63	87.73	86.19	1.12	1.29
	2000	121076				1739.87	86.99			
	2000	118907				1708.70	85.44			
	2000	119231				1713.36	85.67			
	2000	118487				1702.67	85.13			
						Media GLOBAL	86.96			
						S (GLOBAL)	1.97			
						RSD (GLOBAL)	2.27			

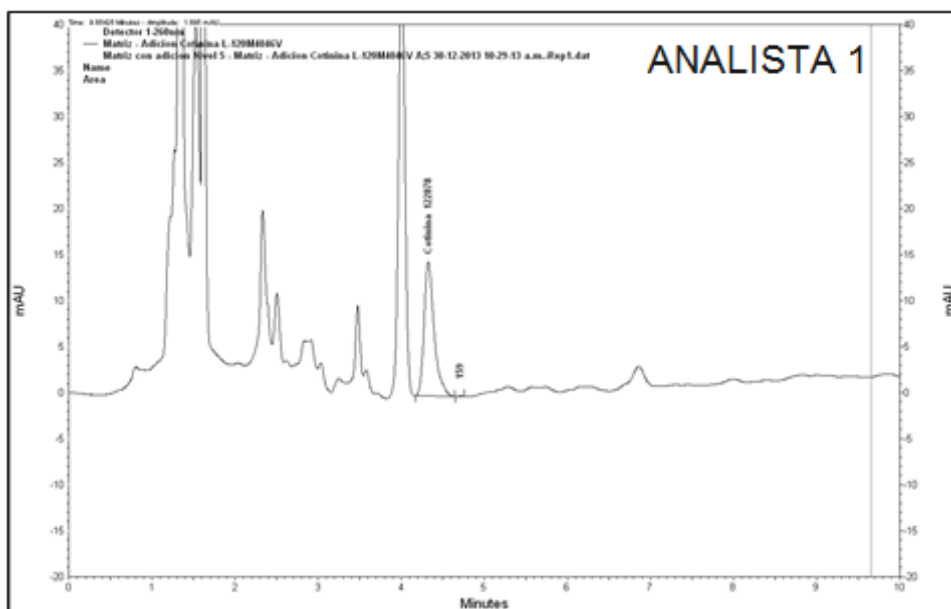


Figura 22. Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 2000ngmL^{-1} por Analista 1

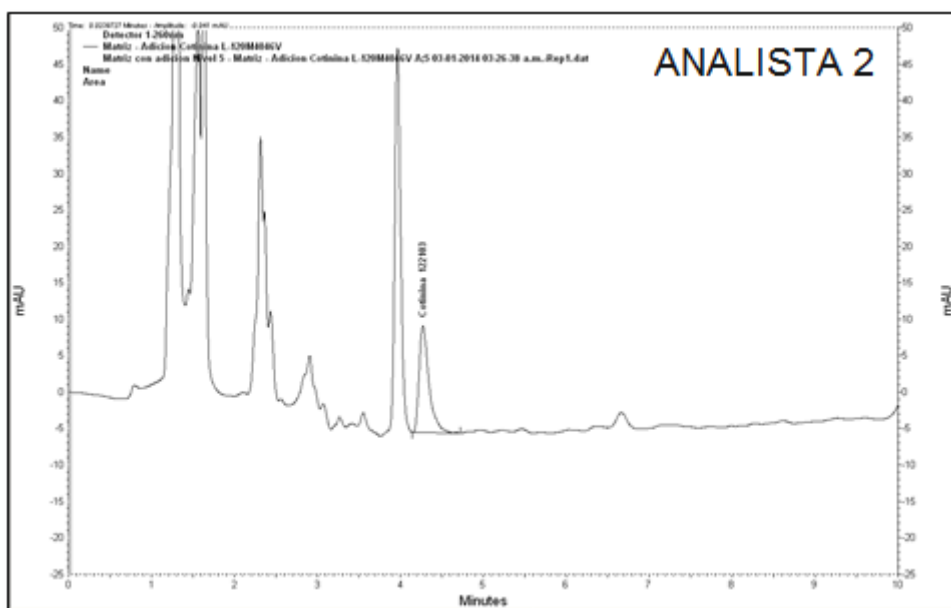


Figura 23. Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 2000ngmL^{-1} por Analista 2

Solución de trabajo a 3000ngmL^{-1}

Se preparó una solución madre de cotinina en metanol con una concentración de $1000\text{ }\mu\text{gmL}^{-1}$; a partir de ésta solución, haciendo las diluciones necesarias se obtuvo una concentración de $18\text{ }\mu\text{gmL}^{-1}$ en metanol; se tomaron entonces $500\text{ }\mu\text{L}$ de la solución

resultante y se diluyeron a un volumen final de 10 mL con la matriz biológica, obteniéndose una concentración de 900 ngmL⁻¹.

Se tomaron 5 mL de la solución, se adicionaron 750 µL de NaOH 1M y se mezcló, seguidamente se agregaron 5 mL de diclorometano, se agitó y se sometió a un baño ultrasónico por un intervalo de 15 minutos, evitando el calentamiento. Luego de haber sido sonificada, la solución se trasladó a un tubo de ensayo para ser centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos para separar las fases.

La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se evaporó hasta sequedad con ayuda de la radiación infrarroja emitida por una lámpara IR de 100W. El Residuo se disolvió con 1500 µL de diluyente y se filtró a través de un filtro para jeringa de 0.22 µm de nylon, y se trasladó a un vial de 1.8 mL para ser inyectado en el cromatógrafo.

Tabla 5c. Resultados para el nivel de concentración 3000 ngmL⁻¹

	Concentración ngmL ⁻¹	Área	Promedio	S	RSD	Concentr Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
Analista 1	3000	199173	198474.80	933.23	0.47	2827.51	94.25	93.92	0.44	0.47
	3000	198615				2819.59	93.99			
	3000	197393				2802.24	93.41			
	3000	199539				2832.71	94.42			
	3000	197654				2805.95	93.53			
Analista 2	3000	194290	196758.60	3281.85	1.67	2791.97	93.07	94.25	1.57	1.67
	3000	195393				2807.82	93.59			
	3000	196019				2816.81	93.89			
	3000	202518				2910.20	97.01			
	3000	195573				2810.40	93.68			
Media GLOBAL							94.08			
S (GLOBAL)							1.10			
RSD (GLOBAL)							1.17			

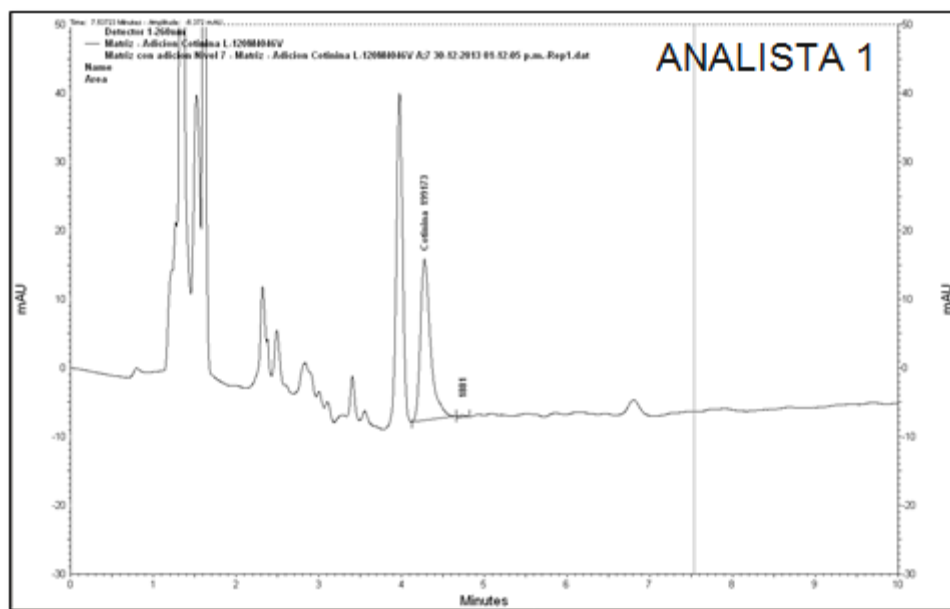


Figura 24. Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 3000ngmL⁻¹ por Analista 1

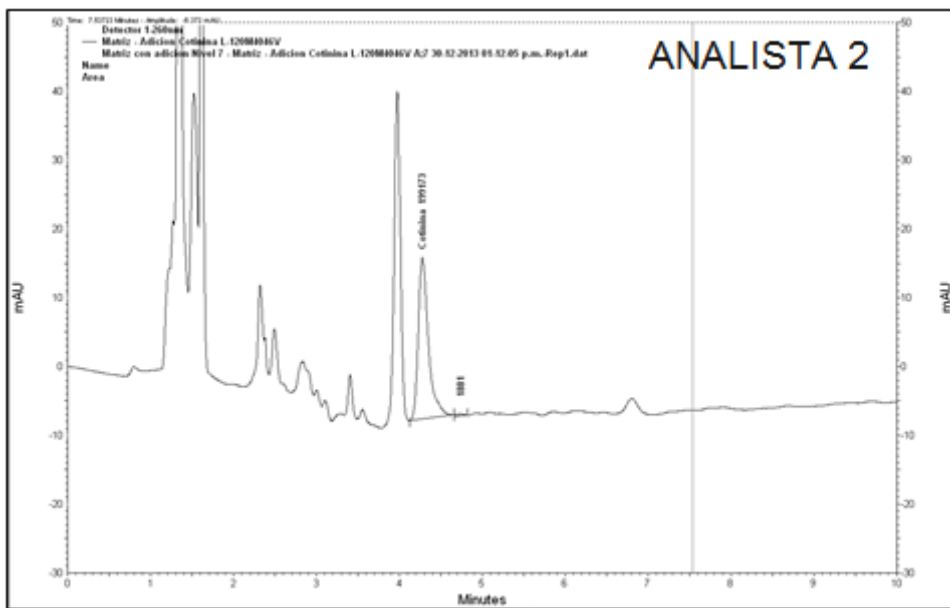


Figura 25. Cromatograma correspondiente al parámetro de Precisión a 3000ngmL⁻¹ por Analista 2

A partir del Coeficiente de Variación, se establece la homogeneidad de las medidas, y en consecuencia el grado de concordancia entre los resultados en las condiciones experimentales previamente establecidas para cada analista y en cada uno de los niveles de concentración, para verificar este parámetro se establece que: “*para la precisión en cada nivel de concentración, el CV (RSD) no deberá de exceder del 15% a excepción en el LDC, en donde el CV no será mayor al 20%*”

Los resultados experimentales indican que el coeficiente de variación máximo obtenido de forma independiente por los analistas fue de 2.80% y entre analistas 2.79%, lo cual indica que no excede el 15% establecido para este parámetro. El método es preciso.

6.4.5 Recobro

Se determinó, comparando la señal debida a la concentración del analito, el cual fue extraído de la matriz biológica y comparando esta con la señal de respuesta del analito puro (estándar).

Se preparó una serie de soluciones estándar a concentraciones conocidas, con los resultados obtenidos se determinó la linealidad del sistema y se estableció el grado de concordancia entre los resultados obtenidos a partir de la regresión. Con la ecuación de la línea recta se determinó el recobro en las muestras biológicas preparadas a concentraciones conocidas.

Tabla 6a. Curva de calibración con estándar.

Concentración ngmL ⁻¹	Área	Promedio	S	RSD	Concentr. Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
100	9797	9489.20	859.70	9.06	97.20	97.20	94.14	8.53	9.06
100	9542				94.67	94.67			
100	10514				104.31	104.31			
100	9448				93.74	93.74			
100	8145				80.81	80.81			
300	25478	26037.40	1682.85	6.46	252.77	84.26	86.11	5.57	6.46
300	27257				270.42	90.14			
300	26844				266.32	88.77			
300	23329				231.45	77.15			
300	27279				270.64	90.21			
1000	91979	91168.80	1957.98	2.15	912.54	91.25	90.45	1.94	2.15
1000	92045				913.20	91.32			
1000	91507				907.86	90.79			
1000	92580				918.50	91.85			
1000	87733				870.42	87.04			
2000	183074	184495.80	3974.40	2.15	1816.31	90.82	91.52	1.97	2.15
2000	185463				1840.01	92.00			
2000	178800				1773.91	88.70			
2000	185465				1840.03	92.00			

2000	189677				1881.82	94.09			
2500	229244	229454.40	2962.83	1.29	2274.37	90.97	91.06	1.18	1.29
2500	227225				2254.34	90.17			
2500	226931				2251.43	90.06			
2500	229547				2277.38	91.10			
2500	234325				2324.78	92.99			
3000	282030	277873.80	2415.63	0.87	2798.07	93.27	91.89	0.80	0.87
3000	275955				2737.80	91.26			
3000	277052				2748.69	91.62			
3000	277761				2755.72	91.86			
3000	276571				2743.92	91.46			
4000	378112	378563.80	1660.96	0.44	3751.32	93.78	93.90	0.41	0.44
4000	378780				3757.95	93.95			
4000	381245				3782.41	94.56			
4000	376791				3738.22	93.46			
4000	377891				3749.13	93.73			
6000	579235	580687.80	1970.76	0.34	5746.70	95.78	96.02	0.33	0.34
6000	579661				5750.93	95.85			
6000	580950				5763.72	96.06			
6000	584015				5794.13	96.57			
6000	579578				5750.11	95.84			
8000	865163	858592.80	6012.45	0.70	8583.45	107.29	106.48	0.75	0.70
8000	853410				8466.85	105.84			
8000	864749				8579.34	107.24			
8000	856848				8500.96	106.26			
8000	852794				8460.74	105.76			
					Media GLOBAL	93.51			
					S (GLOBAL)	6.24			
					RSD (GLOBAL)	6.68			

Tabla 6b. Resultados estadísticas de regresión para curva de calibración con estándar puro

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9980
Coefficiente de determinación R ²	0.9961
R ² ajustado	0.9733
Error típico	24977.4279
Observaciones	45

$$y = ax + b$$

Intercepto = 0.00
Pendiente = 100.79

Tabla 6c. Resultados análisis de varianza para curva de calibración con estándar puro

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	6.9262x10 ¹²	6.9262x10 ¹²	11102.01	1.5518x10 ⁻⁵³
Residuos	44	2.745x10 ¹⁰	623871905		
Total	45	6.9537x10 ¹²			

Los resultados indican que el sistema es lineal con un coeficiente correlación de 0.998. Haciendo uso de la ecuación de la línea recta, se determina el porcentaje de recobro para los resultados obtenidos por cada analista.

Tabla 6d. Comparación de resultados entre analista 1 y 2, para niveles de concentración de 100, 4000 y 8000 ngmL⁻¹.

ANALISTA 1						
Concentración ngmL ⁻¹	Área	Concentración Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
100	6187	61.38	61.38	64.82	9.52	7.29
100	5064	50.24	50.24			
100	7075	70.19	70.19			
100	6780	67.27	67.27			
100	7559	74.99	74.99			
4000	268171	2660.58	66.51	67.43	0.53	1.08
4000	272507	2703.60	67.59	73.04	0.15	1.28
4000	272030	2698.86	67.47			
4000	273663	2715.06	67.88			
4000	273001	2708.50	67.71			
8000	588341	5837.05	72.96			
8000	587535	5829.05	72.86	73.09	73.02	73.26
8000	589381	5847.36	73.09			
8000	588770	5841.30	73.02			
8000	590719	5860.64	73.26			
		Media GLOBAL	68.43			
		S (GLOBAL)	6.21			
		RSD (GLOBAL)	9.08			

ANALISTA 2						
Concentración ngmL ⁻¹	Área	Concentración Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
100	6939	68.84	68.84	65.37	4.77	7.29
100	6444	63.93	63.93			
100	6015	59.68	59.68			

100	6338	62.88	62.88			
100	7211	71.54	71.54			
4000	266477	2643.77	66.09	67.16	0.73	1.08
4000	269844	2677.18	66.93			
4000	273245	2710.92	67.77			
4000	273741	2715.84	67.90			
4000	270501	2683.69	67.09			
8000	573700	5691.79	71.15	72.01	0.92	1.28
8000	587272	5826.44	72.83			
8000	587395	5827.66	72.85			
8000	582992	5783.98	72.30			
8000	571800	5672.94	70.91			
		Media GLOBAL	68.18			
		S (GLOBAL)	3.91			
		RSD (GLOBAL)	5.74			

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.4638	1	0.4638	0.0172	0.8966	4.1960
Dentro de los grupos	754.6207	28	26.9507			
Total	755.0845	29				

La eficiencia del método en la extracción fue evaluada a partir de los resultados obtenidos en el recobro. Con la ecuación de la línea recta se evaluó el área del pico cromatográfico de la señal debida a la cotinina en la muestra biológica, y se determina la concentración real. La concentración de cotinina en la muestra respecto a la concentración teórica indica el recobro, la cual se expresa en términos de porcentaje.

El recobro debe ser preciso, consistente y reproducible, no necesariamente debe ser el 100% según la FDA. Los resultados experimentales presentan un RSD menor al 15%, no existen diferencias significativas entre los analistas ($F_{exp} < F_{tab}$) y un RSD entre analistas de 7.47%. El parámetro es preciso, consistente y reproducible.

6.4.6 Curva de Calibración

Se preparó una curva de calibración, partiendo de pesadas diferentes, y en la misma matriz biológica, con las concentraciones de 100, 300, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000, 6000 y 8000 ngmL^{-1} de cotinina y una muestra blanco libre de cotinina. Para los niveles de concentración de trabajo se consideró los niveles de cotinina posibles en fumadores pasivos y activos.

Tabla 7a. Resultados para curva de calibración.

Concentración ngmL ⁻¹	Área	Promedio	S	RSD	Concentr Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
100	6187	6533.00	959.83	14.69	87.83	87.83	92.74	13.63	14.69
100	5064				71.89	71.89			
100	7075				100.44	100.44			
100	6780				96.25	96.25			
100	7559				107.31	107.31			
300	15884	16758.00	608.95	3.63	225.49	75.16	79.30	2.88	3.63
300	17206				244.26	81.42			
300	17213				244.36	81.45			
300	16349				232.09	77.36			
300	17138				243.30	81.10			
1000	64749	63392.80	1195.59	1.89	919.19	91.92	89.99	1.70	1.89
1000	63842				906.32	90.63			
1000	62012				880.34	88.03			
1000	62264				883.92	88.39			
1000	64097				909.94	90.99			
2000	122878	123581.20	3458.64	2.80	1744.41	87.22	87.72	2.45	2.80
2000	127135				1804.84	90.24			
2000	118210				1678.14	83.91			
2000	126003				1788.77	89.44			
2000	123680				1755.79	87.79			
2500	172575	172678.60	1214.41	0.70	2449.92	98.00	98.06	0.69	0.70
2500	171817				2439.16	97.57			
2500	173412				2461.80	98.47			
2500	174308				2474.52	98.98			
2500	171281				2431.55	97.26			
3000	199173	198474.80	933.23	0.47	2827.51	94.25	93.92	0.44	0.47
3000	198615				2819.59	93.99			
3000	197393				2802.24	93.41			
3000	199539				2832.71	94.42			
3000	197654				2805.95	93.53			
4000	268171	271874.40	2156.84	0.79	3807.02	95.18	96.49	0.77	0.79
4000	272507				3868.58	96.71			
4000	272030				3861.81	96.55			
4000	273663				3884.99	97.12			
4000	273001				3875.59	96.89			
6000	408749	410366.40	1115.17	0.27	5802.70	96.71	97.09	0.26	0.27
6000	411153				5836.83	97.28			
6000	410114				5822.08	97.03			
6000	410170				5822.88	97.05			

6000	411646				5843.83	97.40			
8000	588341	588949.20	1195.89	0.20	8352.24	104.40	104.51	0.21	0.20
8000	587535				8340.80	104.26			
8000	589381				8367.00	104.59			
8000	588770				8358.33	104.48			
8000	590719				8386.00	104.82			

Tabla 7b. Resultados para límite de cuantificación, determinado a partir del cociente de área selectividad / área de límite inferior en la curva de calibración.

Concentración (ngmL ⁻¹)	Área	Promedio	S	RSD	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
VST	1426	1355.00	136.01	10.04	15.03	14.28	1.43	10.04
RAS	1444				15.22			
HDS	1389				14.64			
DMT	1494				15.74			
FMS	1146				12.08			
LAU	1231				12.97			

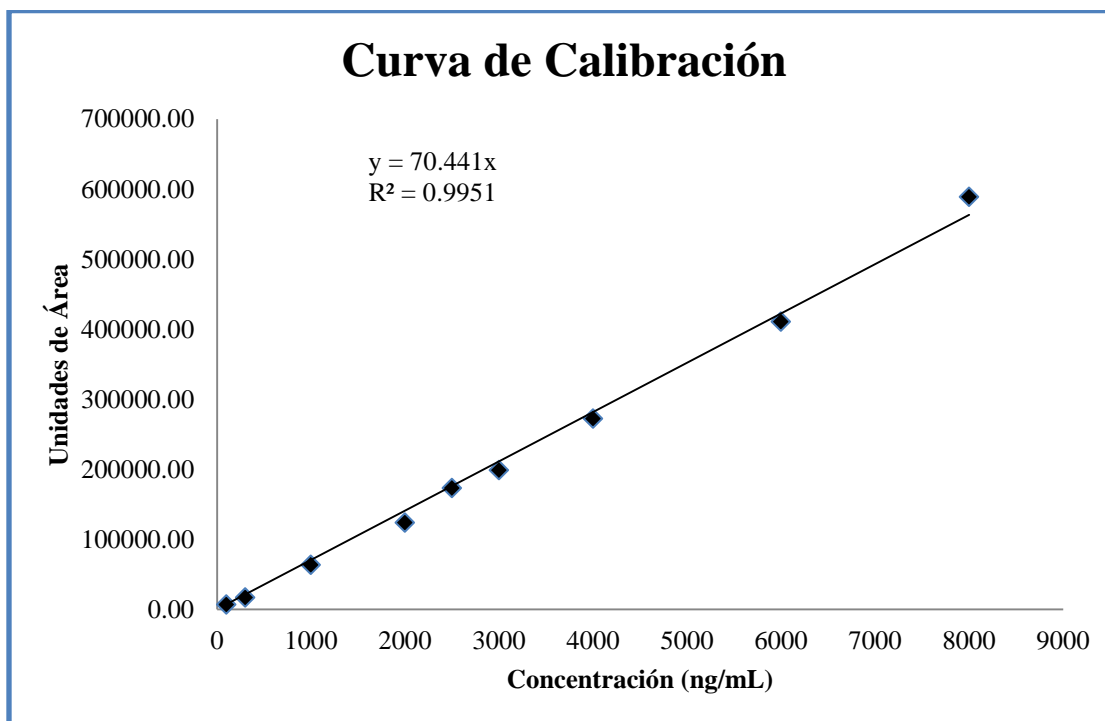


Figura 26. Curva de Calibración

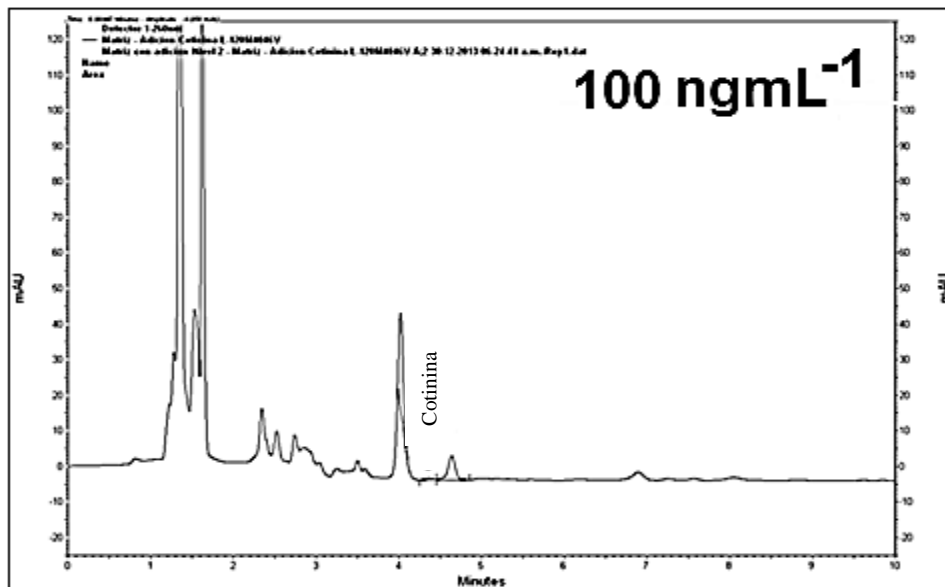


Figura 27. Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 100ngmL^{-1}

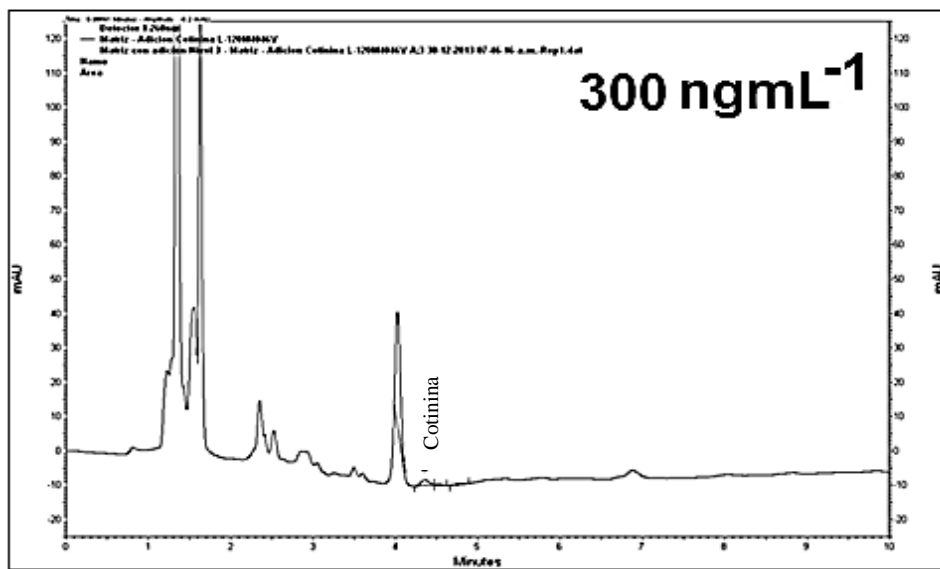


Figura 28. Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 300ngmL^{-1}

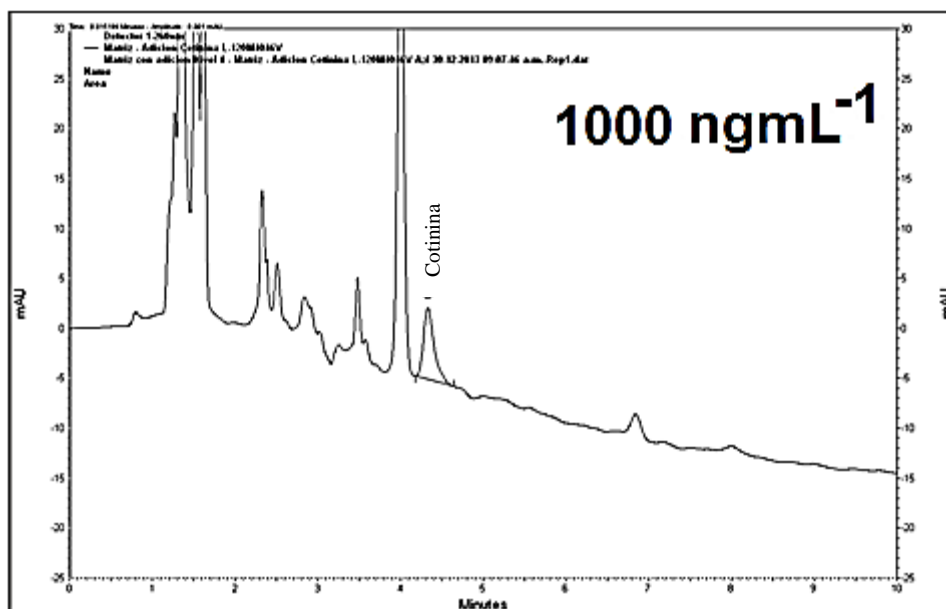


Figura 29. Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 1000ngmL⁻¹

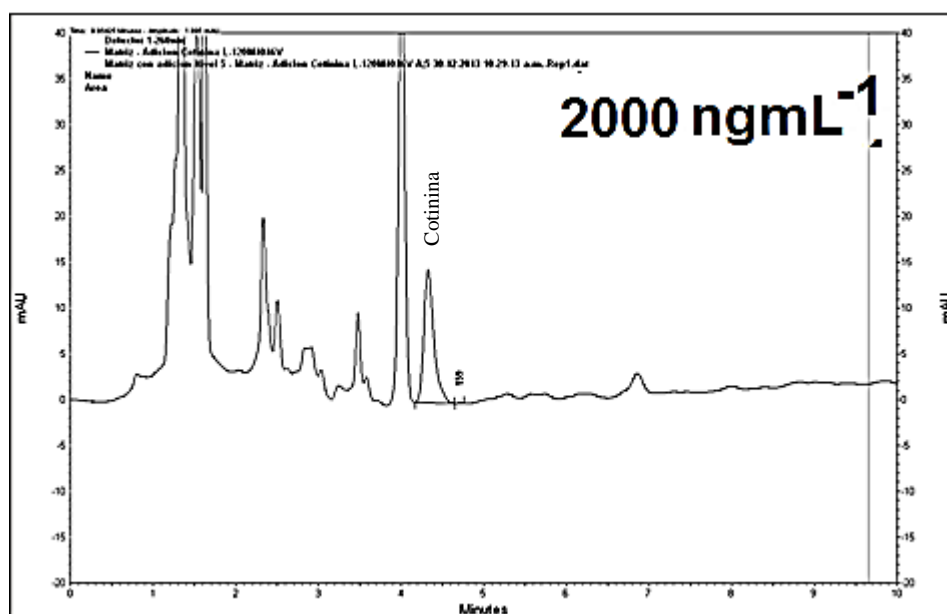


Figura 30. Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 2000ngmL⁻¹

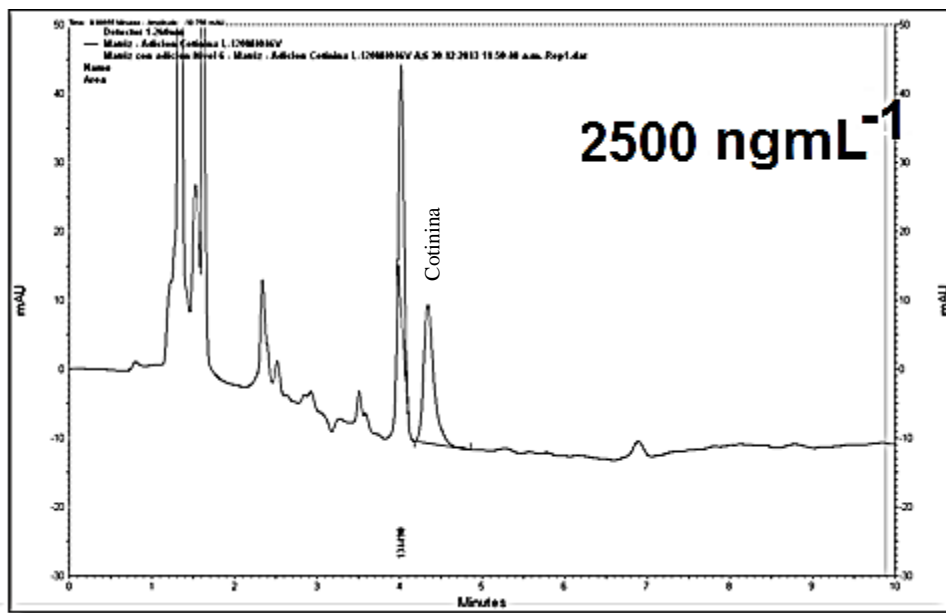


Figura 31. Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 2500ngmL⁻¹

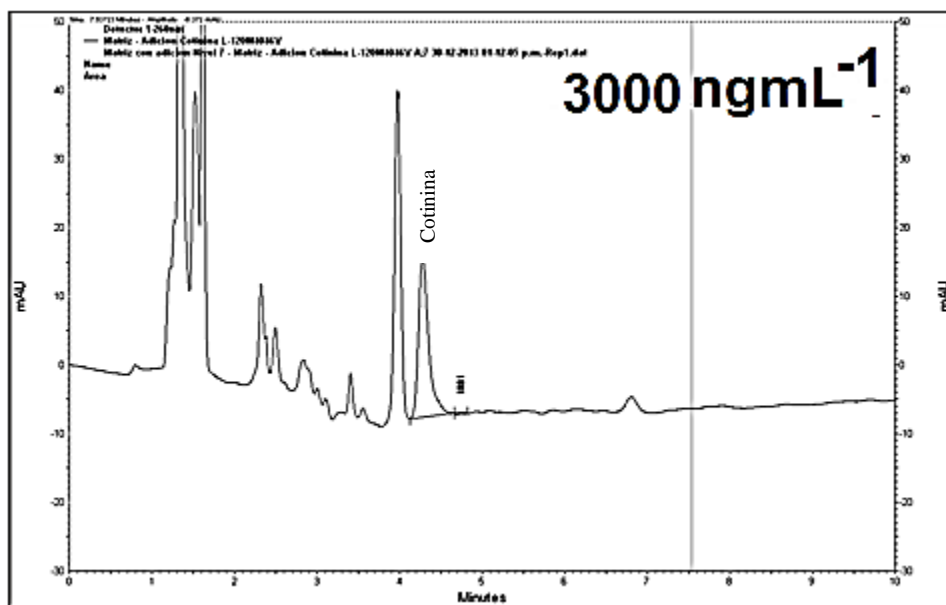


Figura 32. Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 3000ngmL⁻¹

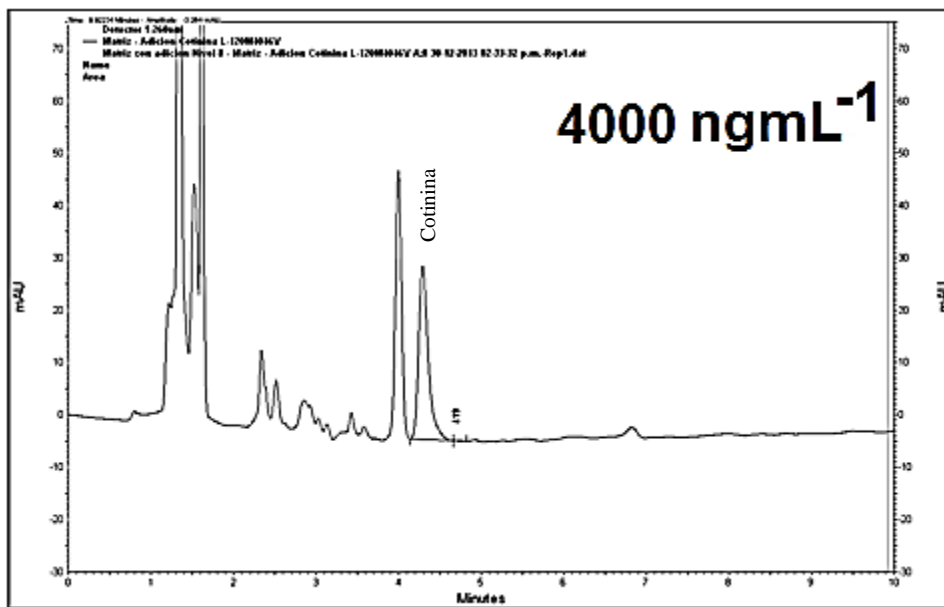


Figura 33. Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 4000ngmL⁻¹

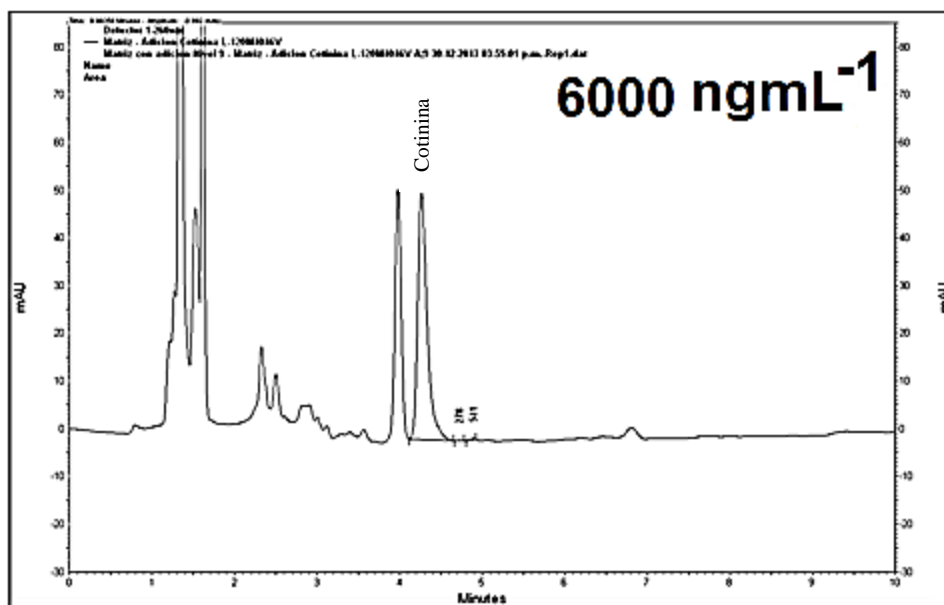


Figura 34. Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 6000ngmL⁻¹

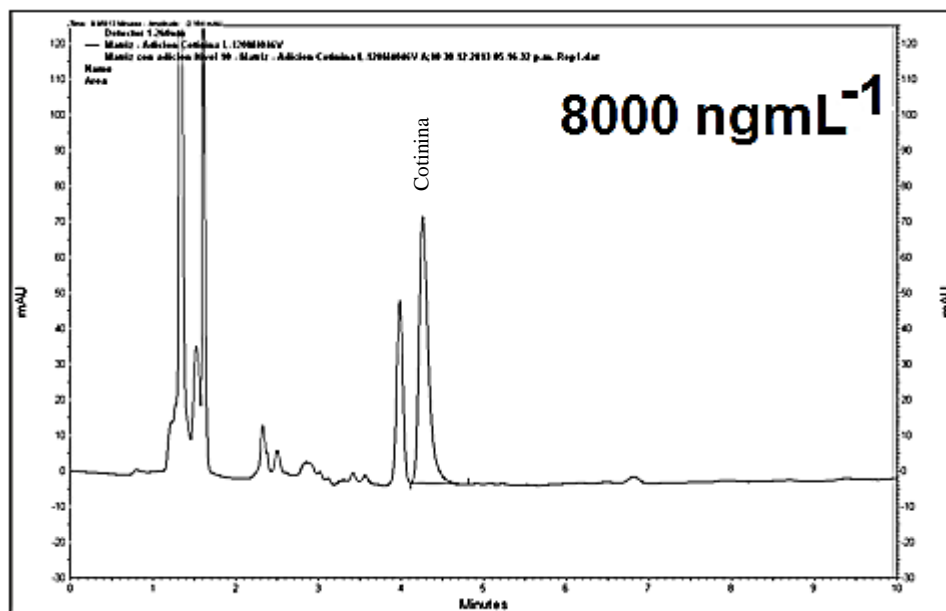


Figura 35. Cromatograma correspondiente al parámetro de Curva de Calibración a 8000ngmL^{-1}

La relación entre la respuesta del instrumento y la concentración del analito se evaluó mediante la curva de calibración agregando cantidades conocidas de cotinina a la matriz biológica de trabajo.

- ✓ “La respuesta de analito para el límite de cuantificación debe ser al menos 5 veces la respuesta del blanco y la señal del analito debe ser identificable, discreta y reproducible, con una precisión no mayor a 20% y una exactitud entre el 80 y 120%”.
- ✓ “Debe tener una desviación no mayor al 20% en el límite de cuantificación respecto al valor nominal y no más de 15% en los demás niveles de concentración, al menos 4 de 6 niveles deben cumplir estos criterios incluyendo el límite de cuantificación y el nivel de concentración más alto”.

La Curva de Calibración fue evaluada con 9 niveles de concentración, incluyendo el límite de cuantificación; éste último es 5 veces la respuesta del blanco; los resultados fueron precisos con un RSD < 15%, exactos con una desviación no mayor al 15% respecto al valor verdadero. Al menos el 66.66% de los resultados cumplen estos requisitos.

6.4.7 Estabilidad de la muestra

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanecería estable en la matriz biológica, durante la manipulación, almacenamiento y su procesamiento. Se evaluó la respuesta de la concentración del analito

en la matriz biológica, en muestras preparadas con dos niveles de concentración dentro del rango, para la prueba se consideró:

- ✓ Ciclos de congelación-descongelación: Se evaluó la estabilidad del analito en la matriz biológica al congelar y descongelar a temperatura ambiente. Se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras.

Tabla 8. Resultados iniciales para estabilidad.

Concentración ngmL ⁻¹	Área	Promedio	S	RSD	Concentr Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
1000	91979	91168.80	1957.98	2.15	912.54	91.25	90.45	1.94	2.15
1000	92045				913.20	91.32			
1000	91507				907.86	90.79			
1000	92580				918.50	91.85			
1000	87733				870.42	87.04			
3000	282030				277873.80	2415.63			
3000	275955				2737.80	91.26			
3000	277052				2748.69	91.62			
3000	277761				2755.72	91.86			
3000	276571				2743.92	91.46			

Tabla 9. Resultados para el primer Ciclo de congelación-descongelación.

Concentración ngmL ⁻¹	Área	Promedio	Concentr Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)	Desviación %
1000	58442	58787.00	839.82	83.98	84.48	0.80	0.95	-5.52
1000	59429		854.00	85.40				
1000	58490		840.51	84.05				
3000	193840		196155.67	2785.50				
3000	193024		2773.77	92.46				
3000	201603		2897.05	96.57				

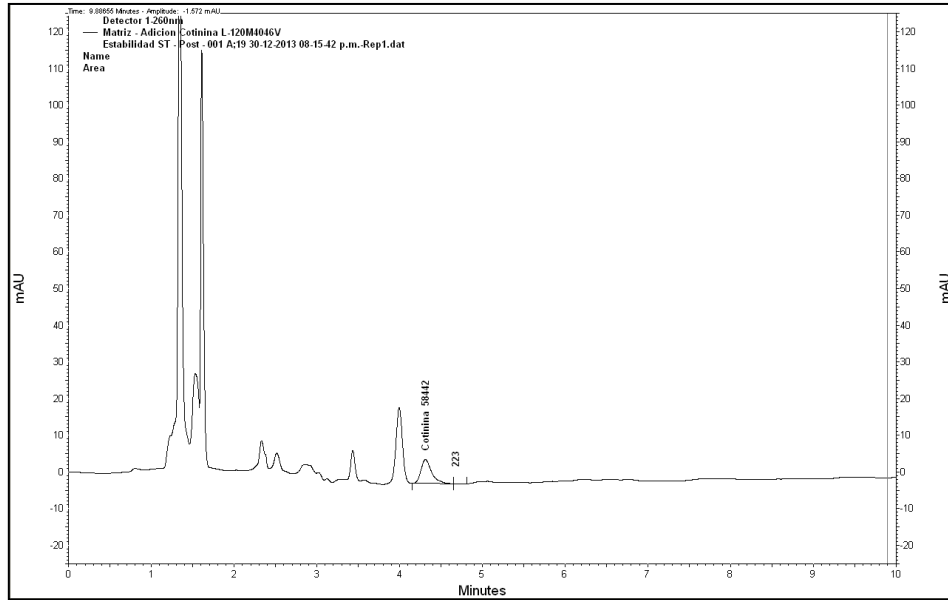


Figura 36. Cromatograma del primer ciclo de congelación-descongelación para 1000ngmL^{-1}

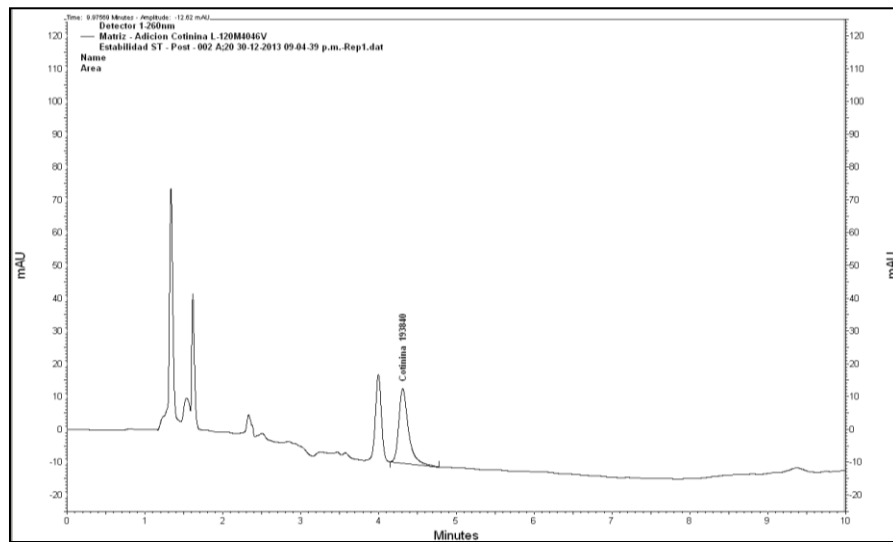


Figura 37. Cromatograma del primer ciclo de congelación-descongelación para 3000ngmL^{-1}

Tabla 10. Resultados para el segundo Ciclo de congelación-descongelación.

Concentración ngmL ⁻¹	Área	Promedio	Concentr Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)	Desviación %
1000	55824	57954.33	802.20	80.22	83.28	2.91	3.49	-6.71
1000	59853		860.09	86.01				
1000	58186		836.14	83.61				
3000	198827	198539.67	2857.16	95.24	95.10	0.28	0.30	1.18
3000	197858		2843.24	94.77				
3000	198934		2858.70	95.29				

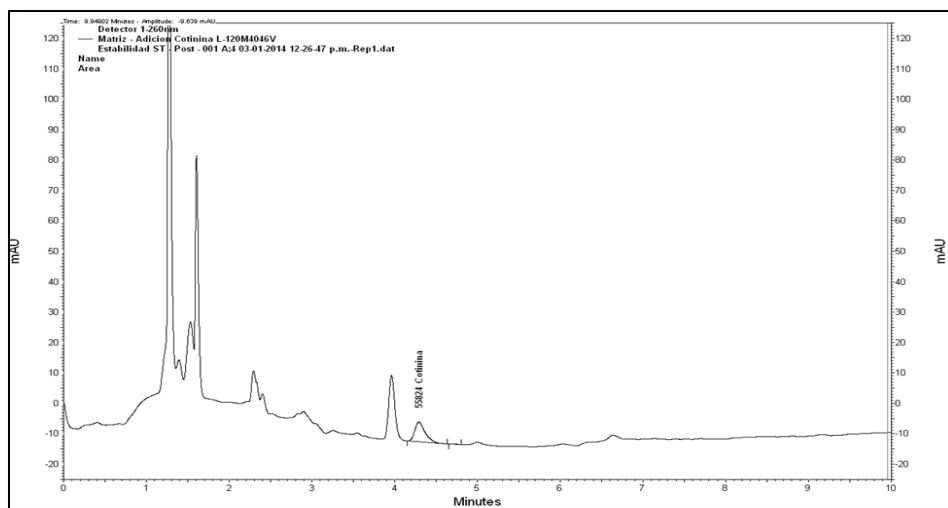


Figura 38. Cromatograma del segundo ciclo de congelación-descongelación para 1000ngmL⁻¹

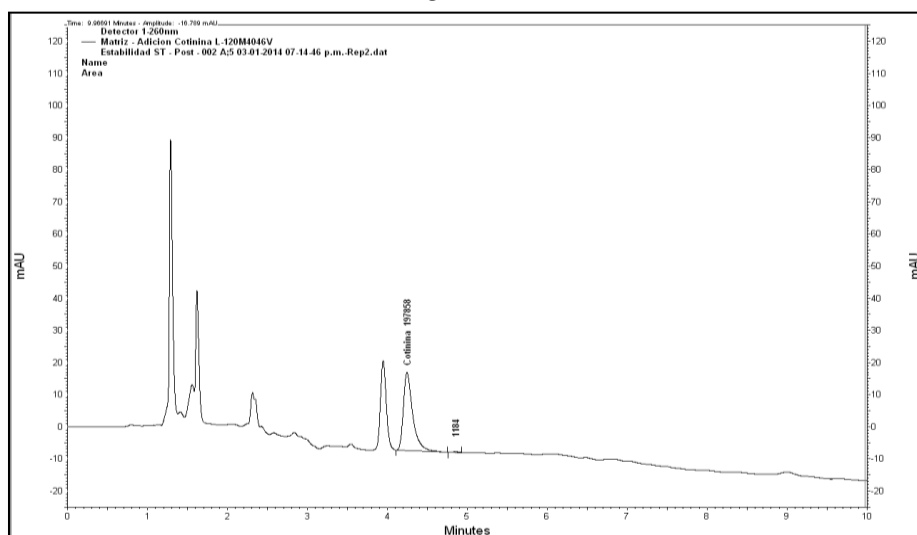


Figura 39. Cromatograma del segundo ciclo de congelación-descongelación para 3000ngmL⁻¹

Tabla 11. Resultados para el tercer Ciclo de congelación-descongelación.

Concentración ngmL ⁻¹	Área	Promedio	Concentración Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)	Desviación %
1000	45256	45720.00	650.33	65.03	65.70	3.01	4.58	-24.29
1000	48005		689.84	68.98				
1000	43899		630.83	63.08				
3000	185748	183293.00	2669.22	88.97	87.80	2.70	3.08	-6.12
3000	176842		2541.24	84.71				
3000	187289		2691.36	89.71				

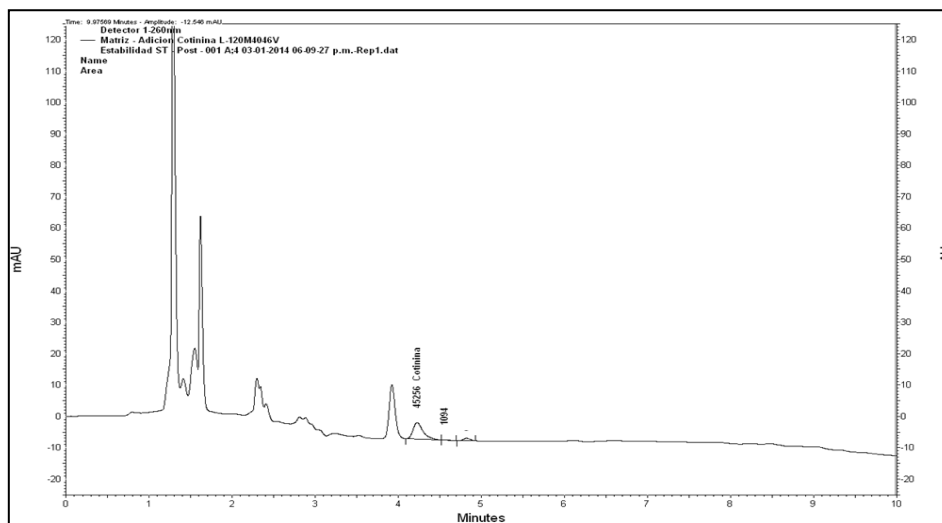


Figura 40. Cromatograma del tercer ciclo de congelación-descongelación para 1000ngmL⁻¹

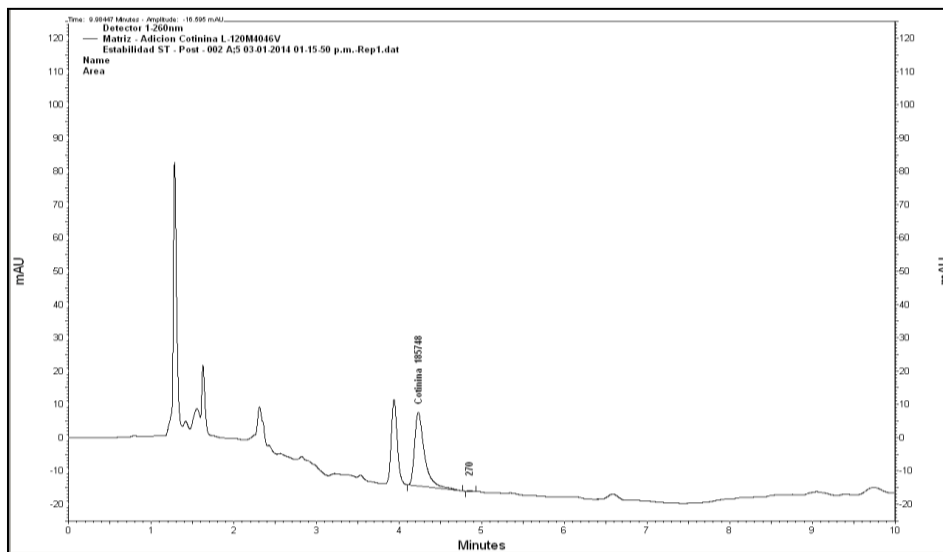


Figura 41. Cromatograma del tercer ciclo de congelación-descongelación para 3000ngmL⁻¹

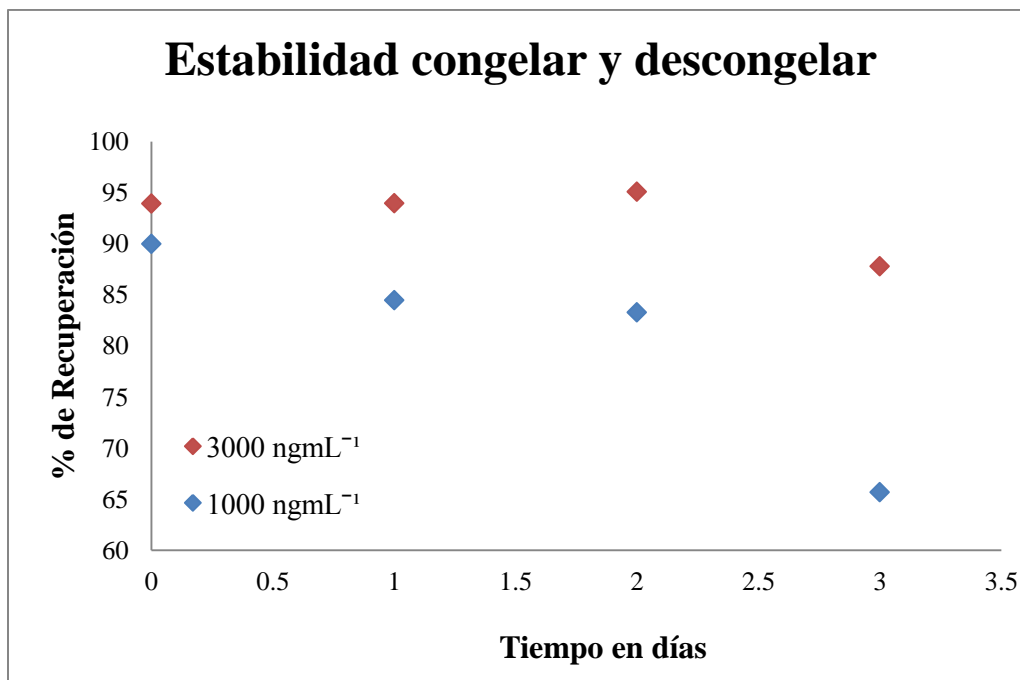


Figura 42. Estabilidad al congelar-descongelar para 1000 ngmL⁻¹ y 3000 ngmL⁻¹ % de Recuperación vs Tiempo en días.

- ✓ Temperatura a corto plazo: Se evaluó descongelando hasta temperatura ambiente y manteniéndolas en estas condiciones durante 6 horas antes de analizar las muestras. Se evaluó con los resultados obtenidos en el primer ciclo de “Congelación y descongelación”.
- ✓ Almacenamiento a largo plazo: Se evaluó la estabilidad del analito en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrían las muestras, por un periodo equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis. Se evaluó con los resultados obtenidos en el tercer ciclo de “Congelación y descongelación”.
- ✓ Estabilidad post preparativa: Se evaluó al finalizar el set de soluciones preparadas en la secuencia de trabajo del día, considerando el tiempo de residencia en el automuestreador antes de ser analizada.

Tabla 12. Resultados para la estabilidad post preparativa.

Concentración ngmL ⁻¹	Área	Promedio	S	RSD	Concentr Real	% RECUP	Media (%)	S (%)	RSD (%)
1000	62696	64698.67	2079.33	3.21	900.95	90.09	92.97	2.99	3.21
1000	66847				960.60	96.06			
1000	64553				927.63	92.76			
3000	209746	201352.67	7413.62	3.68	3014.07	100.47	96.45	3.55	3.68
3000	198614				2854.10	95.14			
3000	195698				2812.20	93.74			

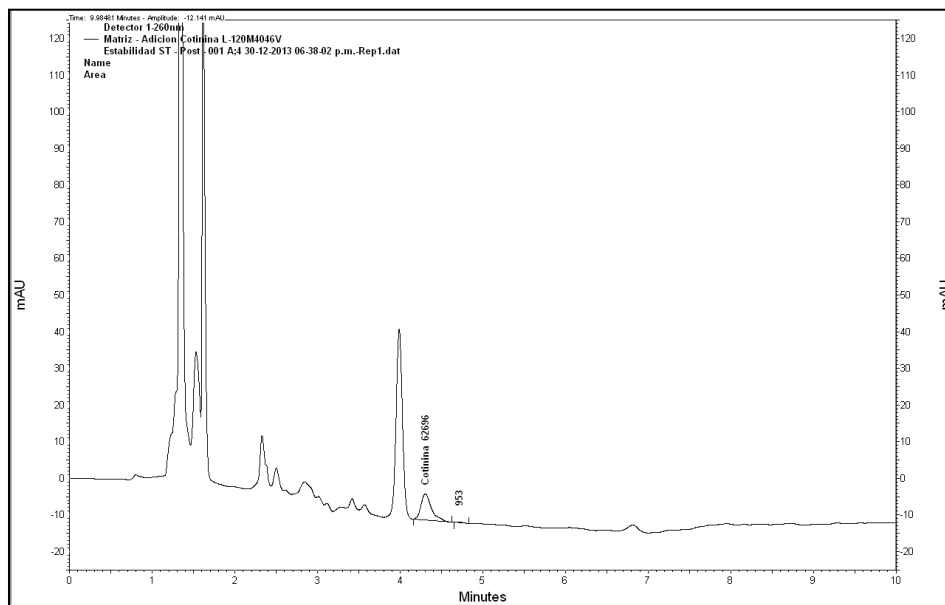


Figura 43. Cromatograma correspondiente al parámetro de estabilidad post preparativa para 1000ngmL⁻¹

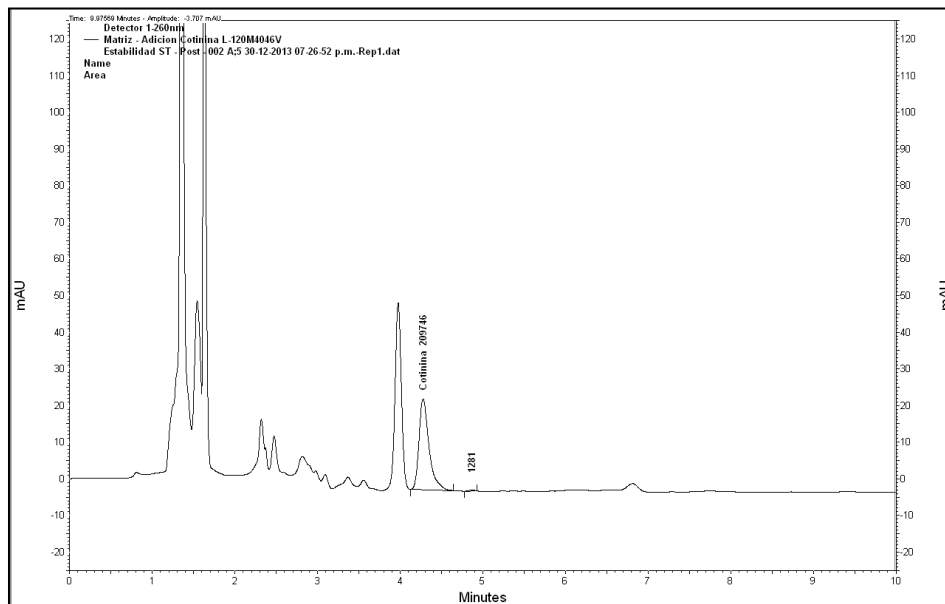


Figura 44. Cromatograma correspondiente al parámetro de estabilidad post preparativa para 3000ngmL⁻¹

- ✓ Estabilidad de las soluciones de trabajo: Se evaluó la estabilidad de las soluciones de trabajo a temperatura ambiente luego de 6 horas.
Se evaluó con los resultados obtenidos en “Estabilidad post preparativa”.

La estabilidad de la cotinina en el método se evaluó en función de las condiciones de almacenamiento y tiempo. Luego de tres días de almacenamiento en las condiciones previamente establecidas, la cotinina sufrió una degradación cercana al 24% para la concentración más baja (1000 ngmL^{-1}) y cerca del 6% para la concentración más alta (3000 ngmL^{-1}). La muestra se mantiene estable a corto plazo y mediano plazo, lo cual permite manipularla durante su preparación sin sufrir una degradación.

En las diferentes condiciones de almacenamiento el método es exacto y preciso, sin embargo en la última etapa de congelamiento y descongelamiento, la muestra preparada con 1000 ngmL^{-1} de cotinina no cumple exactitud y repetibilidad en las condiciones de almacenamiento establecidas, esto puede atribuirse a un error en la manipulación de la muestra.

6.1 Análisis de muestras fumador activo y pasivo.

Se recolectaron 100 mL de orina de un fumador activo y un fumador pasivo, las cuales se evaluaron con el método bioanalítico validado, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 13. Resultados para el análisis de muestras de fumador activo y pasivo.

	Área	Promedio	S	RSD	Concentración Real ngmL^{-1}
FUMADOR ACTIVO	100613	101593.67	1368.43	1.35	1445.82
	101011				1451.54
	103157				1482.38
FUMADOR PASIVO	59038	59103.33	595.69	1.01	848.38
	59729				858.31
	58543				841.27

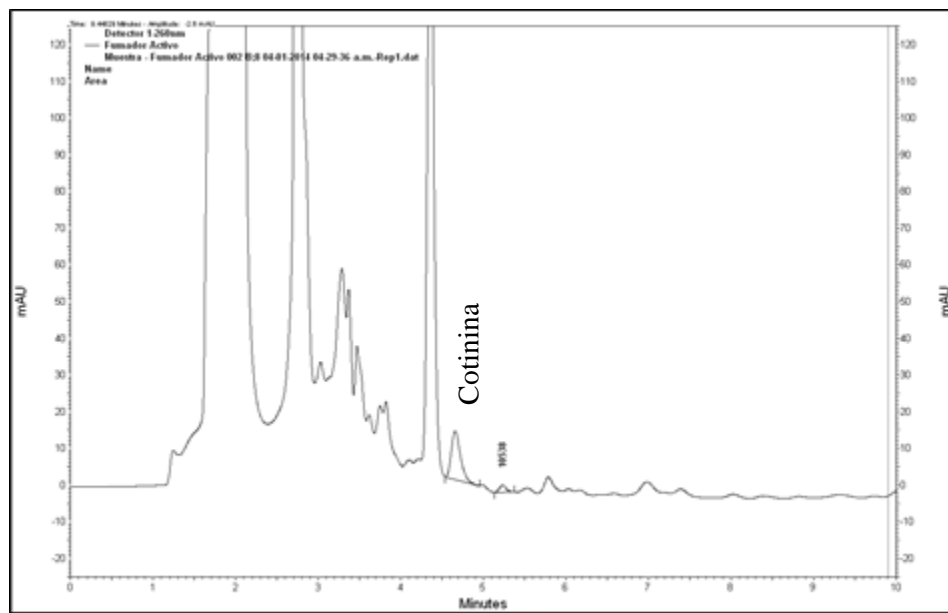


Figura 45. Cromatograma correspondiente a la muestra del fumador activo

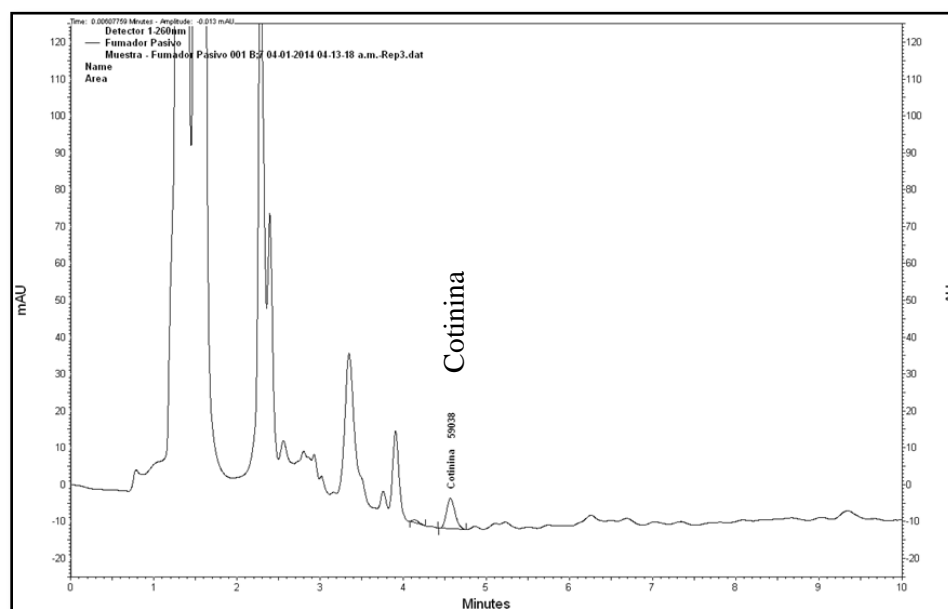


Figura 46. Cromatograma correspondiente a la muestra del fumador pasivo

La funcionalidad del método fue verificada a partir de análisis de cotinina en un fumador activo y un fumador pasivo, del mismo núcleo familiar. Se determinó 849 ngmL^{-1} de cotinina en el fumador pasivo, y 1459 ngmL^{-1} de cotinina en el fumador activo; en función de la concentración de cotinina encontrada en el fumador pasivo se puede deducir que cerca del 58% del humo de cigarrillo es absorbido por el fumador involuntario.

7. CONCLUSIONES

En el desarrollo de la metodología, se determinó que las mejores condiciones cromatográficas en las cuales la cotinina tiene una mejor resolución, es a pH ácido, incrementando la señal debida al analito y disminuyendo el tiempo de retención; sin embargo, al evaluar una muestra biológica, conteniendo una cantidad conocida de cotinina, se observó que existían interferencias muy cercanas al tiempo de retención de la cotinina. A mayor pH, la cotinina presenta una señal menos intensa y mayor tiempo de retención, pero menos interferencias en la muestra biológica. Debido a que el pH era un factor importante, se controló manteniendo la fase móvil a un pH mayor al utilizado en el diluyente.

Se determinó que con las condiciones cromatográficas establecidas, la longitud de onda en la que el analito presentó mayor absorción fue a 260 nm.

La guía para la Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA (Administración de Drogas y Alimentos), establece en caso de métodos químicos, que la exactitud se determina a partir del valor medio, y este debe estar dentro del 15% del valor real, excepto en el Límite de Cuantificación, donde no debe diferir en más de un 20%. El valor medio experimental fue 90.54% y este se encuentra dentro del 15% respecto al valor real (9.46%), en base a los resultados obtenidos se cumple el parámetro de exactitud.

La precisión del método se evaluó por nivel de concentración y comparando los resultados con un segundo analista en días diferentes. En el nivel de concentración de 1000 ngmL^{-1} , el RSD para el primer analista fue de 1.89% y para el segundo analista de 1.69%. En el nivel de concentración de 2000 ngmL^{-1} , el RSD para el primer analista fue de 2.80% y para el segundo analista 1.29%. Para el tercer nivel de concentración a 3000 ngmL^{-1} , el RSD para el primer analista fue de 0.47% y para el segundo analista 1.67%. En cada uno de los niveles el RSD no excedió el 15%. El RSD global (los tres niveles de concentración y con ambos analistas) fue de 3.43%. El método es preciso.

El parámetro Recobro, fue evaluado comparando la señal debida a la concentración del analito de la muestra sometida a la extracción de la matriz biológica y comparando esta señal, con la de señal de respuesta del analito puro. Se compararon los resultados obtenidos entre los analistas 1 y 2, con tres niveles de concentración: 100, 4000 y 8000 ngmL^{-1} . En todos los casos el resultado fue preciso (RSD máximo 7.29%), consistente y reproducible.

La Curva de Calibración fue evaluada con 9 niveles de concentración, incluyendo el límite de cuantificación; para éste último, el resultado fue preciso (RSD de 14.69%), exacto (92.74%) y el valor medio posee una desviación de -7.26%. En 8 de 9 niveles de concentración la desviación no es mayor al 15% (Desviación máxima - 20.70% y mínima

de -1.94%), cumpliéndose el criterio de que al menos el 66.66% de los resultados deben cumplirlo (4 de 6).

La estabilidad del analito se avaluó al someter la muestra preparada a concentraciones conocidas de 1000 y 3000 ngmL⁻¹ a pruebas de congelamiento-descongelamiento, y evaluándose a corto, mediano y largo plazo. La muestra se mantuvo estable en los primeros dos ciclos de congelamiento-descongelamiento, sin embargo, en el tercer ciclo de congelamiento-descongelamiento, la muestra preparada a 1000 ngmL⁻¹ sufrió una desviación de -24.29%, dicha desviación pudo deberse a problemas en el inyector del equipo, sin descartar una posible degradación del analito. El RSD máximo fue de 4.58%.

El método fue puesto a prueba evaluando dos muestras reales: una de un fumador activo y otra de un fumador pasivo, ambos del mismo núcleo familiar. Con base en resultados obtenidos, se puede concluir que cerca del 58.17%, respecto al fumador activo, es absorbido por un fumador pasivo, en un ambiente de fumadores.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la parte experimental y en base al análisis de cada parámetro concluimos que el método bioanalítico validado, puede ser utilizado para la determinación de cotinina en muestras de orina humana y así poder evaluar su impacto en la salud de la población expuesta al humo de tabaco.

8. RECOMENDACIONES

1. Para poder disminuir el límite de cuantificación se recomienda realizar la metodología presentada aplicando la técnica HPLC con un detector más sensible, como por ejemplo un detector de masas.
2. Se recomienda almacenar las muestras a una temperatura al menos de -20°C para asegurar la estabilidad del analito.
3. Para aumentar la eficiencia en la extracción de cotinina en las muestras biológicas, se recomienda utilizar diversos solventes o mezclas de solventes y/o el uso de la extracción en fase sólida, y de esta forma verificar cual presenta mejor porcentaje de extracción.
4. El presente trabajo puede ser utilizado como una guía base, para verificar los niveles de exposición al humo de tabaco y utilizarse como una herramienta para diagnosticar adecuadamente la enfermedad del tabaquismo.
5. Se recomienda también realizar un estudio donde se tomen varias muestras de orina de un mismo individuo durante un mismo día, para identificar la cinética del metabolito.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antonio Gerardo L. I.; Tesis; **TABAQUISMO**. Universidad Veracruzana Facultad de Medicina, 2006.
2. Arreseygor B, Müller F, **TABAQUISMOS RECURSOS DIAGNÓSTICOS (PRIMERA PARTE)** Rev CONAREC; (22), 84:84-89 Mayo-Junio 2006.
3. Augusto V. Ramírez; **BIOMARCADORES EN MONITOREO DE EXPOSICIÓN A METALES PESADOS EN METALURGIA**, Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 49-58. 2006.
4. Ávila Z. G. et al. **QUÍMICA ORGÁNICA, EXPERIMENTOS CON UN ENFOQUE ECOLÓGICO**, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM, México, 2001.
5. Benowitz NL. **COTININE AS A BIOMARKER OF ENVIRONMENTAL TOBACCO SMOKE EXPOSURE**. Epidemiol Rev; 18 (2): 188-203. 1996.
6. Benowitz NL. **PHARMACOLOGIC ASPECTS OF CIGARETTE SMOKING AND NICOTINE ADDICTION**. N Engl J Med; 319: 1318-1330, 1988.
7. Burns D. **CIGARETTES AND CIGARETTE SMOKING**. Clin Chest Med; 12:631-642. 1991.
8. Capelo Martínez, José Luis. **ULTRASOUND IN CHEMISTRY**. Wiley-Vch. 2009.
9. CNPT Informe; **IMPACTO POTENCIAL EN LA PREVALENCIA Y EN LA MORTALIDAD DE LAS MEDIDAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DEL TABAQUISMO**. Redactor: Rodrigo Córdoba García Diciembre 2010.
10. E.P.A. **RESPIRATORY HEALTH EFFECTS OF PASSIVE SMOKING**. Environmental Protection Agency 600/6- 90/006F. Washington DC 20460. Diciembre 2002.
11. Eurachem **MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO. GUÍA DE LABORATORIO PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS Y TEMAS RELACIONADOS**, segunda edición, 2005.
12. European Medicines Agency (EMA) **GUIDELINE ON BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION**, 2012.
13. FDA **GUIDANCE FOR INDUSTRY, BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION**, 2001.

14. FDA **GUIDELINE FOR INDUSTRY, TEXT ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURE** ICH Q2A Marzo 1994.
15. Fessenden R. J. and Fessenden J. S. **ORGANIC LABORATORY TECHNIQUES**. Brooks/Cole , USA., 1993.
16. Georgina Jiménez Lozano **ESTUDIO DE LA INTERVENCION ESPECIALIZADA EN LA DESHABITUACIÓN TABÁQUICA EN PACIENTES HOSPITALIZADOS**. Editoriales Universidad de Granada, España Septiembre 2006.
17. Gokani VN, Kulkarni PK, Parikh JR, Saiyed HN, **DETERMINACIÓN DE NICOTINA Y COTININA EN ORINA DE RECOLECTORAS DE TABACO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA**. Journal of Chromatography B, 802; 323-328. 2004.
18. IUPAC; **NOMENCLATURE FOR CHROMATOGRAPHY, PURE & APPLIED CHEMISTRY**, Vol. 65, No4, pp. 819-872, 1993.
19. Jiménez Ruiz C. A. **COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL TABACO**. Manuales SEPAR volumen I. Madrid: Aula Médica, 15-22.1995.
20. Jiménez Ruiz C. A. Fagerstrom K. O. **MANUAL PRÁCTICO DE LA TERAPIA SUSTITUTIVA CON NICOTINA EN EL TRATAMIENTO DEL TABAQUISMO**. Barcelona: Novartis; 9-18. 2000.
21. José Antonio Cobacho; **HISTORIA DEL TABACO ORIGEN Y EXPANSIÓN**, Editorial Universitaria de Murcia, 2004.
22. Kamer, Barbara et al; **AN EVALUATION OF COTININE AS AN INDEX OF EXPOSURE TO TABACCO SMOKE IN CHILDREN WITH RECURRENT RESPIRATORY TRACT INFECTIONS USING HPLC METHOD**, American Journal of Analytical Chemistry, 4, 54-62, 2013.
23. Karina Malpica; **ORIGEN E HISTORIA DEL TABACO**, revista Home Grown art. 330 Medellin Colombia, 2003.
24. Le Houezec J, Benowitz N. L. **BASIC AND CLINICAL PSYCHOPHARMACOLOGY OF NICOTINE**. Clin Chest Med; 12:681-699. 1991.
25. Lydia Galagovsky Kurman; **QUÍMICA ORGÁNICA FUNDAMENTOS TEÓRICOS-PRÁCTICOS PARA EL LABORATORIO**. 5ª ed. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 1987.

26. Massadeh, Adnan M, et al; ***A SINGLE-STEP EXTRACTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF NICOTINE AND COTININE IN JORDANIAN SMOKERS' BLOOD AND URINE SAMPLES BY RP-HPLC AND GC-MS.*** Journal of Chromatographic Science, vol. 47, 2009.
27. Oscar Alberto Quattrocchi et al. ***INTRODUCCIÓN A LA HPLC, APLICACIÓN Y PRÁCTICA,*** Artes Graficas Farro, Argentina 1992.
28. Organización Panamericana de la salud; ***LA EPIDEMIA DEL TABACO.*** publicación científica nº 577. EUA. 2000 p. 23-31 Washington. dc 2007.
29. PAHO www.paho.org/els.
30. Rabbaa-Khabbaz L, Abi D, Karam D; ***UN SIMPLE SENSITIVO Y RÁPIDO MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE COTININA EN ORINA POR HPLC CON DETECTOR DE UV*** Journal of Chromatographic Science, Vol. 44, October 2006.
31. Ramos Pinedo A, Steen B, García-Salmones Martín M; ***ESTUDIO CLÍNICO Y DIAGNÓSTICO DEL FUMADOR.*** Monografía de Neumomadrid, volumen VII. Madrid: ERGON: 87-99; 2004.
32. Saiz Martínez, Acitores I, Rubio Colavida J, Espiga López I, Alonso de la Iglesia B, Blanco Aguilar J, Cortés Mancha M et al.; ***PLAN NACIONAL DE PREVENCIÓN Y CONTROL DEL TABAQUISMO.*** Rev España Salud Pública, 77: 441-473. 2003.
33. Soler Cataluña J. J.; ***ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.*** En: Villasante C (Ed). Enfermedades Respiratorias. Madrid: Aula Médica sl; 471-483. 2002.
34. The United States Pharmacopeia (USP); ***CHROMATOGRAPHY,*** National Formulary 31, 2013.
35. Torrecilla García M.; ***EL PACIENTE QUE VA A DEJAR DE FUMAR.*** Editores. Manual de Prevención y Tratamiento del Tabaquismo. Ediciones PAUAN S.L, 101-115. 2001.
36. Tutka P, Mosiewicz J, Wielosz M.; ***PHARMACOKINETICS AND METABOLISM OF NICOTINE.*** Pharmacological reports; 57: 143-153. 2005.

37. Vacchino MS, Velurtas SM, Salinas GP, Garcialoredo H. H.; ***DETERMINACIÓN DE COTININA Y EXPOSICIÓN A TABACO*** Ata Bioquím Clin Latino; 40(2): 181- 5. 2006.
38. Yanie B. C.; José H.; ***BREVE HISTORIA DEL TABACO***, ed 2º club de Pipa fumadores, Uruguay 2000.