

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Caracterización fisicoquímica de un  
péptido polivalente, derivado de la  
Lactoferricina Bovina, candidato a  
fármaco para el tratamiento del Cáncer de  
Mama**

**Kevin Andrey Huertas Ortiz**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia  
2021



**Caracterización fisicoquímica de un péptido polivalente, derivado  
de la Lactoferricina Bovina, candidato a fármaco para el  
tratamiento del Cáncer de Mama**

**Kevin Andrey Huertas Ortiz**

Tesis de investigación presentada como requisito para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Química**

Directora:

Zuly Jenny Rivera Monroy, PhD.

Codirectora:

Ivonne Alejandra González Cárdenas. MSc.

Línea de Investigación:

Química Analítica

Grupo de Investigación:

Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2021



*“They say ‘doubt everything,’ but I disagree. Doubt is useful in small amounts, but too much of it leads to apathy and confusion. No, don’t doubt everything. QUESTION everything. That’s the real trick. Doubt is just a lack of certainty. If you doubt everything, you’ll doubt evolution, science, faith, morality, even reality itself — and you’ll end up with nothing, because doubt doesn’t give anything back. But questions have answers, you see. If you question everything, you’ll find that a lot of what we believe is untrue... but you might also discover some things ARE true. You might discover what your own beliefs are. And then you’ll question them again, and again, eliminating flaws, discovering lies, until you get as close to the truth as you can.*

*Questioning is a lifelong process. That’s precisely what makes it so unlike doubt. Questioning engages with reality, interrogating all it sees. Questioning leads to a constant assault on intellectual status quo, where doubt is far more likely to lead to resigned acceptance. After all, when the possibility of truth is doubtful (excuse the pun), why not simply play along with the most convenient lie?*

*Questioning is progress, but doubt is stagnation.”*

*The Talos Principle*

## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Nombre Kevin Andrey Huertas Ortiz

Fecha 21/06/2022

## Agradecimientos

Agradezco a MINCIENCIAS por la financiación del proyecto: *"Desarrollo de un medicamento contra el cáncer de mama basado en un péptido polivalente derivado de la LfcinB - Estudio de la fase preclínica (fase cero): caracterización fisicoquímica de un lote del fármaco para estudios pre-clínicos"* (RC-706).

A la Universidad Nacional de Colombia, a la Facultad de Ciencias y al programa de Maestría en Ciencias-Química, por la financiación de mis estudios de posgrado con la Beca Auxiliar Docente. Al Departamento de Química, que me brindó la oportunidad de formarme como profesional y donde pude desarrollar parte de la experimentación de mi tesis de maestría.

Al Instituto Nacional de Metrología (INM) donde aprendí sobre metrología química, que complementó mi formación como profesional y fue de complemento para esta tesis; asimismo, por brindarme sus espacios e instrumentación para el desarrollo de esta investigación.

A mi hermano Jhonny Huertas y a su esposa Marcela Serrano, quienes fueron los primeros en apoyarme para que iniciara mis estudios de posgrado y a mi madre, Luz Marina Ortiz, quien siempre ha estado a mi lado apoyándome incondicionalmente en mis proyectos personales

A mis amigos, quienes me han acompañado desde antes de iniciar esta maestría y fueron de gran apoyo emocional para sobrellevar el aislamiento durante la pandemia del COVID-19.

Al profesor Javier Eduardo García, quien ha sido muy importante tanto en mi formación profesional como personal, sus aportes a este trabajo desde la perspectiva farmacéutica fueron enriquecedores para estructurar y complementar este trabajo.

A mi codirectora Ivonne González, quien fue mi guía durante mi estadía en el Instituto y quien estuvo siempre atenta en todo momento con el avance de mis investigaciones, sus aportes desde la metrología química fueron vitales para la validación de las metodologías analíticas empleadas en este trabajo.

Agradezco inmensamente a mi directora de tesis, la profesora Zuly Rivera, a quien admiro mucho y siempre ha sido una inspiración para mí. Sus consejos y apoyo, tanto académico como personal, han permitido que crezca inmensamente como profesional y como ser humano, le debo a la profesora mi amor por la química analítica y admiro demasiado la dedicación que tiene por su vocación como docente.

Por último, agradezco a mis compañeros del grupo SAMP, quienes me aconsejaron y me acompañaron gran parte del tiempo en el desarrollo de esta maestría, debo agradecer especialmente a Diego Insuasty quien fue de gran apoyo y ayuda en este trabajo.

## Resumen

**Título en Español:** *Caracterización fisicoquímica de un péptido polivalente, derivado de la Lactoferricina Bovina, candidato a fármaco para el tratamiento del Cáncer de Mama*

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de mama es el tipo de cáncer más incidente entre las mujeres. Para el 2020 se reportaron cerca de 2,3 millones de nuevos casos de cáncer de mama y 685.000 muertes en el mundo fueron causadas por esta enfermedad. En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, se ha propuesto el uso de péptidos polivalentes derivados de la Lactoferricina Bovina (LfcinB), y se han encontrado tres péptidos con actividad citotóxica frente a líneas celulares derivadas del cáncer de mama: el palíndromo LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>: RWQWRWQWR; el dímero [<sup>26</sup>F]-LfcinB (20-30): (RRWQWRFKCLG)<sub>2</sub>K-Ahx y el tetramero LfcinB (20-25)<sub>4</sub>: ((RRWQWR)<sub>2</sub>K-Ahx-C)<sub>2</sub>.

Para desarrollo de un medicamento, una etapa crucial en la *fase cero* de los estudios preclínicos es la caracterización fisicoquímica de la molécula que presenta actividad promisoriosa, esta fase involucra la implementación y validación de los métodos que serán utilizados para el análisis de la molécula. Esta investigación fue conducida dentro de este contexto, y se seleccionó el péptido tetramérico LfcinB (20-25)<sub>4</sub> como molécula modelo. Específicamente: (i) se sintetizó un lote de 100 mg del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, (ii) se desarrolló y optimizó un método de análisis de péptidos sintéticos por RP-HPLC, (iii) se caracterizó el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> mediante RMN (1D-2D) y espectrometría de masas (ESI-Q, ESI-QTOF, MALDI-TOF).

Adicionalmente, (iv) se analizó en el lote el contenido de agua por Karl Fischer, el contenido de TFA residual por HPLC-DAD y el contenido del péptido por RP-HPLC-DAD, estas tres metodologías de cuantificación fueron validadas siguiendo los lineamientos de la USP capítulo <1225>.

Las metodologías de análisis implementadas, desarrolladas y validadas en esta tesis contribuyen a la caracterización fisicoquímica de péptidos promisorios como agentes terapéuticos.

**Palabras clave:** péptidos anticancerígenos, validación, caracterización fisicoquímica, agentes terapéuticos, HPLC, espectrometría de masas

## Abstract

**English Title:** *Physicochemical characterization of a polyvalent peptide, derived from Bovine Lactoferricin, drug candidate for Breast Cancer treatment.*

According to World Health Organization, breast cancer is the most common cancer type among women. In 2020, around 2,3 million of new cases of breast cancer were reported and 685.000 of deaths were caused by this disease. In the search of new therapeutic agents, polyvalent peptides derived from Bovine Lactoferricin (LfcinB) were proposed. Three peptides were found with cytotoxic activity against breast cancer cell lines: palindrome RWQWRWQWR; dimer (RRWQWRFKCLG)<sub>2</sub>K-Ahx and tetramer LfcinB (20-25)<sub>4</sub>: ((RRWQWR)<sub>2</sub>K-Ahx-C)<sub>2</sub>.

One of the crucial steps on the *zero-phase* of preclinical studies, for development of a new drug, is the physicochemical characterization of the molecule with promissory activity. This phase involves implementation and validation of methods that shall be used for the analysis of the molecule. This research was conducted within this context, and the tetrameric peptide LfcinB (20-25)<sub>4</sub> was selected as model molecule. Specifically: (i) a batch of 100 mg of peptide LfcinB (20-25)<sub>4</sub> was synthesized, (ii) a method for the analysis of peptides by RP-HPLC was developed and optimized, (iii) peptide LfcinB (20-25)<sub>4</sub> was characterized by NMR (1D-2) and mass spectrometry (ESI-Q, ESI-QTOF, MALDI-TOF). In addition, (iv) water content by Karl Fischer, TFA content by HPLC-DAD and peptide content by

RP-HPLC-DAD were analyzed in the batch of peptide; these three quantitation methodologies were validated according to USP guidelines in chapter <1225>.

The analytical methodologies implemented, developed, and validated on this thesis contribute to physicochemical characterization of promissory peptides as therapeutic agents.

**Keywords:** Therapeutic peptides, validation, physicochemical characterization, therapeutic agents, HPLC, mass spectrometry.

# Contenido

<b>1. Introducción .....</b>	<b>25</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>28</b>
2.1 Antecedentes.....	28
2.1.1 Péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana y citotóxica.....	28
2.1.2 Caracterización de péptidos sintéticos.....	31
2.1.3 Validación de metodologías analíticas.....	32
2.2 Planteamiento del problema.....	36
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>38</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>39</b>
4.1 Objetivo General:.....	39
4.2 Objetivos Específicos: .....	39
<b>5. Metodología .....</b>	<b>40</b>
5.1 Síntesis de LfinB (20-25) <sub>4</sub> mediante SPPS- Fmoc/tBu .....	40
5.1.1 Acondicionamiento de la resina (Paso 1, Figura 3).....	41
5.1.2 Reacción de unión de los aminoácidos a la resina (Paso 2, Figura 3).....	41
5.1.3 Desprotección de las cadenas laterales y desanclaje del péptido de la resina (Paso 3, Figura 3).....	42
5.1.4 Purificación por SPE (Paso 4, Figura 3).....	42
5.1.5 Formación del tetrámero (Paso 5, Figura 3) .....	43
5.2 Análisis de péptidos por RP-HPLC – Fase exploratoria: .....	44
5.3 Análisis de péptidos por espectrometría de masas.....	44
5.3.1. MALDI-TOF .....	44
5.3.2. ESI-Cuadrupolo .....	45
5.3.3. LC-MS ESI-QTOF.....	45
5.4. Análisis del dímero precursor y el tetrámero LfcinB (20-25) <sub>4</sub> por RMN.....	45
5.5. Plan de Validación.....	46
5.5.1. Descripción de metodologías validadas.....	49
5.5.1.1 <i>Karl Fischer</i> .....	49
5.5.1.2 <i>Análisis de TFA</i> .....	51
5.5.1.3 <i>Medición del contenido de péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub></i> .....	53

5.5.2 Selectividad/Especificidad .....	54
5.5.3 Linealidad e Intervalo .....	56
5.5.3.1. <i>Determinación de intervalo lineal, intervalo dinámico y límites de detección y cuantificación</i> .....	56
5.5.3.2 <i>Definición del intervalo de trabajo</i> .....	56
5.5.3.3 <i>Realización de la curva de calibración y evaluación del intervalo</i> .....	57
5.5.3.4 <i>Evaluación de la linealidad</i> .....	57
5.5.3.5 <i>Análisis de residuales</i> .....	58
5.5.3.6 <i>Análisis de la varianza (ANOVA)</i> .....	58
5.5.4 Veracidad .....	59
5.5.4.1 <i>Valor verdadero</i> .....	59
5.5.4.2 <i>Evaluación de veracidad</i> .....	59
5.5.5 Precisión .....	60
5.5.5.1 <i>Procedimiento experimental</i> .....	60
5.5.5.2 <i>Evaluación de precisión</i> .....	60
5.5.6 Robustez .....	61
5.5.6.1 <i>Selección de los factores y los niveles</i> .....	62
5.5.6.2 <i>Selección de los diseños experimentales</i> .....	62
5.5.6.3 <i>Metodología de superficies de respuesta</i> .....	62
5.5.6.4 <i>Procedimiento experimental</i> .....	63
5.5.7 Test de Idoneidad del Sistema (System Suitability Test).....	63
<b>6. Resultados y discusión .....</b>	<b>65</b>
6.1 Etapa 1. Desarrollo y optimización del método para el análisis de péptidos sintéticos por RP-HPLC .....	66
6.1.1 Van Deemter.....	67
6.1.2 Gráficas cinéticas .....	71
6.1.3 Desarrollo y optimización del método de análisis .....	73
6.1.3.1 <i>Desarrollo del método</i> .....	73
6.1.3.2 <i>Optimización del método</i> .....	79
6.2 Etapa 2. Síntesis del lote de 100 mg del péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> .....	81
6.3 Etapa 3. Caracterización del péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> empleando RMN y MS .....	83
6.3.1 Análisis por RMN .....	83
6.3.2 Análisis por espectrometría de masas .....	86
6.3.2.1 <i>Análisis por ESI-cuadrupolo</i> .....	86
6.3.2.2 <i>Análisis por ESI-QTOF</i> .....	88
6.3.2.3 <i>Análisis por MALDI-TOF</i> .....	90
6.3.2.4 <i>Seguimiento reacción descarboxilación del Trp por UHPLC-ESI-QTOF</i> ....	92
6.4 Etapa 4. Validación de la metodología para determinar el contenido de agua por Karl Fischer .....	94
6.4.1 Selectividad .....	94
6.4.2 Linealidad.....	95
6.4.3 Veracidad y Precisión (repetibilidad y precisión intermedia) .....	98
6.4.4 Robustez .....	101

---

6.4.5 Contenido de agua en el péptido.....	103
6.5 Etapa 5. Validación de la metodología para la determinación del contenido de TFA residual por HPLC.....	103
6.5.1 Selectividad.....	103
6.5.2 Linealidad – Exploratorio.....	105
6.5.3 Linealidad.....	105
6.5.4 Límite de detección y cuantificación.....	108
6.5.5 Repetibilidad y precisión intermedia.....	109
6.5.6 Veracidad: Sesgo como porcentaje de recuperación.....	112
6.5.7 Robustez.....	113
6.5.8 Porcentaje de TFA en el péptido.....	115
6.6 Etapa 6. Validación de la metodología para la determinación del contenido del péptido por RP-HPLC.....	115
6.6.1 Selectividad.....	115
6.6.2 Linealidad - exploratorio.....	120
6.6.3 Linealidad.....	120
6.6.4 Análisis relativo al contenido de Trp en el péptido.....	123
6.6.5 Cuantificación del péptido usando la curva de calibración de L-Trp.....	125
6.6.6 Precisión (Repetibilidad y precisión intermedia).....	126
6.6.7 Robustez.....	129
<b>Conclusiones.....</b>	<b>131</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>134</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>143</b>
<b>Anexo A. Resultados complementarios al contenido de agua por Karl Fischer. ....</b>	<b>143</b>
<b>Anexo B. Resultados complementarios a la cuantificación del péptido por HPLC-DAD.....</b>	<b>146</b>
<b>Anexo C. System Suitability.....</b>	<b>149</b>
<b>Anexo D. Estimación de la incertidumbre.....</b>	<b>152</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Caracterización del péptido LfcinB (20-25). Análisis por RP HPLC: A) Perfil cromatográfico del producto crudo , B) Perfil cromatográfico del del producto purificado por RP-SPE. Análisis por espectrometría de masas: C) Espectro MALDI-TOF del péptido puro, la señal corresponde a la especie $[M+H]^+$ .....	31
Figura 2. Tasa de incidencia y mortalidad en Colombia para los 10 tipos de cáncer más prevalentes. Tomado de (36). .....	36
<b>Figura 3.</b> Esquema de la síntesis del tetrámero LfcinB (20-25) <sub>4</sub> . .....	40
Figura 4. Esquema de la purificación de péptidos por RP-SPE, tomado de (26).....	43
<b>Figura 5</b> Gráficas de van Deemter obtendias para la columna empacada Kromasil EternityXT (verde), columna monolítica Chromolith HighResolution (morado), columnas Core-Shell Kromasil EternityShell (azul) y SunShell (rojo) para el análisis de A) ácido benzoico y B) péptido LfcinB (20-25) Fase Móvil: agua-TFA 0,05%: acetonitrilo-TFA 0,05% 85:15 v/v, temperatura ambiente, $\lambda = 210$ nm, inyección 5,0 $\mu$ L. Ambos analitos preparados a 1 mg/mL. ....	69
Figura 6 Gráficas cinéticas para la columna empacada Kromasil EternityXT (verde), columna monolítica Chromolith HighResolution (morado), columnas Core-Shell Kromasil EternityShell (azul) y SunShell (rojo) para el análisis de A) ácido benzoico and B) péptido LfcinB (20-25). Fase Móvil: agua-TFA 0,05%: acetonitrilo-TFA 0,05% 85:15, temperatura ambiente, $\lambda = 210$ nm, inyección 5,0 $\mu$ L. ....	73
Figura 7 Perfiles cromatográficos de la mezcla de péptidos para las columnas A) Kromasil EternityXT (método 1, 10,0 $\mu$ L); B).Chromolith HighResolution (método 1, 5,0 $\mu$ L). $\lambda = 210$ nm. $t_{delay} = 1,0$ min. Los asteriscos indican el par crítico seleccionado para comprar las separaciones. Estos picos corresponden específicamente a los péptidos FKRRWQWRMKKLGA y (RRWQWR) <sub>2</sub> -K-Ahx-C .....	76
Figura 8 Perfiles cromatográficos de la mezcla de péptidos para las columnas: A) Kromasil EternityShell (método 2, 5,0 $\mu$ L); B) SunShell (método 2, 5,0 $\mu$ L). $\lambda = 210$ nm. $t_{delay} = 1,0$ min. Los asteriscos indican el par crítico seleccionado para comparar las	

separaciones; específicamente los péptidos FKRRWQWRMKKLG y (RRWQWR) <sub>2</sub> -K-Ahx-C.....	78
Figura 9 Perfiles cromatográficos de la optimización basada en la ecuación del k* para las columnas Kromasil EternityShell (A: método 3, B: método 4) y SunShell (C: método 3, D: método 4). Inyección = 5,0 µL. λ = 210 nm. t <sub>delay</sub> = 1,0 min. Los asteriscos indican el par crítico seleccionado para comparar las separaciones; específicamente los péptidos FKRRWQWRMKKLG y (RRWQWR) <sub>2</sub> -K-Ahx-C.....	80
Figura 10 A) Perfil cromatográfico del dímero precursor puro y monitoreo de la reacción de oxidación C) perfil cromatográfico del péptido tetramérico puro. Columna: Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm), Inyección = 5,0 µL. λ = 210 nm.....	82
Figura 11 Espectro <sup>1</sup> H RMN de: (A) dímero precursor, (B) tetramero LfcinB (20-25) <sub>4</sub> . Solvente DMSO-d <sub>6</sub> .....	84
Figura 12 Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY de: (A) dímero precursor y (B) tetramero LfcinB (20-25) <sub>4</sub> . 1. Protones alifáticos; 2. αH y βH de Arg, Lys, Gln; 3. αH y βH de Cys, Trp; 4. H anillo aromático, H cadena lateral Gln; 5. Zona huella dactilar. Solvente DMSO-d <sub>6</sub> .....	85
Figura 13 Espectros ESI-cuadrupolo del dímero precursor y tetramero LfcinB (20-25) <sub>4</sub> . Los números en naranja indican la carga de la especie. ....	87
Figura 14 Espectros ESI-QTOF del péptido dímero y tetramero. La ampliación muestra la distribución isotópica del pico base. ....	89
Figura 15 Espectros MALDI-TOF del péptido dímero y tetramero. ....	91
Figura 16 Reacción de desprotección del grupo Boc en el triptófano.....	92
Figura 17 Análisis del dímero precursor crudo por UHPLC-ESI-QTOF. (A) Perfil cromatográfico TIC en tiempo 0 horas (Azul) y después de 12 horas (rojo) de preparada la solución de dímero crudo. (B) Espectro ESI-QTOF a: t <sub>R</sub> 4.3 min, la ampliación muestra la distribución isotópica del pico base. (C) Espectro ESI-QTOF a t <sub>R</sub> 4.4 min, el pico base corresponde a la especie carboxilada. ....	93
Figura 18 Boxplot de las medidas del péptido y de los blancos de metanol para la evaluación de selectividad del método de Karl Fischer.....	95
Figura 19 Curvas de calibración a altas cantidades de agua (izquierda) y bajas cantidades de agua (derecha). ....	96
Figura 20 Gráficas de residuales de las curvas a altas cantidades de agua (izquierda) y bajas cantidades de agua (derecha).....	97
Figura 21 Gráfica de Daniel para la evaluación de la robustez. Los factores e interacciones fuera de la diagonal se consideran no robustos o variables críticas. ....	102
Figura 22 Gráfica de efectos principales para la validación del contenido de agua por Karl Fischer.....	102
Figura 23 Mezcla de TFA (t <sub>R</sub> 2.53 min) con ácido acético (t <sub>R</sub> 3.85 min) con pureza de pico y cromatograma 3D 190-300 nm. ....	104

Figura 24 TFA ( $t_R$ 2.52 min) analizado en matriz (péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> ) con pureza de pico.....	104
Figura 25 (izquierda) Gráfica de área en función de la concentración de TFA, saturación a 18,0 mg/g de TFA; (derecha) gráfica del factor de respuesta en función de la concentración de TFA, intervalo lineal de 0,10 hasta 1,00 mg/g de TFA. ....	105
Figura 26 Gráfica linealidad de TFA. Intervalo de trabajo 0,10 – 0,70 mg/g de TFA. ....	106
Figura 27 Gráfica de residuales para el modelo lineal (izquierda) y el modelo cuadrático (derecha).....	107
Figura 28 Gráficas Q-Q de los residuales de los modelos lineal (izquierda) y cuadrático (derecha).....	107
Figura 29 Curva de calibración a bajas concentraciones de TFA. Intervalo de trabajo: 0,02-1,00 mg/g. ....	108
Figura 30 Boxplot de los resultados de repetibilidad y precisión intermedia. D1 = día 1; D2 = día 2. ....	111
Figura 31 Superficies de respuesta para las interacciones: A) longitud de onda:Fuerza iónica; B) Longitud de onda:Flujo; C) Flujo:Fuerza iónica. ....	114
Figura 32 Perfil cromatográfico en 2D a 210 nm y en 3D de 200 a 400 nm de la mezcla péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> con impurezas del producto crudo. 5-50% B en 8 min, Fase móvil: Agua-TFA 0,05%:ACN-TFA 0,05% (solvente B).....	116
Figura 33 Optimización del método de análisis por HPLC-DAD a 210 nm para transferencia a UHPLC-QTOF.....	118
Figura 34 TIC de la mezcla del péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> junto con sus impurezas del producto crudo (rojo) y del péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> (verde).....	118
Figura 35 Perfil TIC del pico correspondiente al péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> junto con los espectros de masas analizados en 5 secciones del pico. ....	119
Figura 36 (izquierda) Gráfica de área en función de la concentración del péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> ; (derecha) gráfica del factor de respuesta en función de la concentración del péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> , intervalo lineal de 0,09 hasta 2,00 mg/g de péptido. ....	120
Figura 37 Curva de calibración del péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> a 210 nm. Intervalo de trabajo 0,40 – 1,60 mg/g.....	121
Figura 38 Gráficas de residuales para el ajuste de los datos de la curva de calibración del del tetrámero LfcinB (20-25) <sub>4</sub> al modelo lineal (izquierda) y cuadrático (derecha). ....	122
Figura 39 Curvas de calibración para el tetrámero LfcinB (20-25) <sub>4</sub> (izquierda) y el L-Trp (derecha) medidas a 280 nm. Intervalo de trabajo: LfcinB (20-25) <sub>4</sub> 0,40 – 1,60 mg/g; L-Trp 0,08-0,32 mg/g. ....	123
Figura 40 Gráfica de residuales para el péptido (izquierda) y el Trp (derecha) medidos a 280 nm. ....	124
Figura 41 Boxplot del estudio de precisión para el péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> .....	128

---

Figura 42 Superficies de respuesta de las interacciones de los factores Longitud de onda, % TFA y Flujo en el estudio de robustez del método de análisis del péptido LfcinB (20-25) <sup>4</sup> . .....	130
--	-----

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Elementos requeridos para la validación de metodologías analíticas.....	35
<b>Tabla 2</b> Plan de validación para los analitos evaluados en el producto de síntesis del péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> .....	46
<b>Tabla 3.</b> Supuestos para la ANOVA y la regresión lineal, las pruebas estadísticas son aplicadas con un $\alpha = 0,05$ .....	59
Tabla 4 Características de las columnas C-18 empleadas.....	67
Tabla 5 Resumen de los parámetros de van Deemter (A, B y C), $u_{opt}$ y $H_{min}$ para las columnas evaluadas.....	68
Tabla 6 Lista de péptidos sintéticos analizados y organizados por orden de elución con los S y $k^*$ calculados. Ahx: ácido 6-aminohexanoico, Fluores: fluoresceína. ....	74
Tabla 7 Métodos aplicados y optimizados para el análisis de la mezcla de péptidos. El Método 1 fue aplicado en las columnas Kromasil EternityXT y Chromolith HighResolution; métodos 2, 3 y 4 fueron aplicados en columnas Kromasil EternityShell y SunShell. ....	77
Tabla 8 Desplazamientos químicos de los protones para los péptidos dimérico y tetramérico. Las señales de Cys corresponden sólo al dímero precursor. ....	86
Tabla 9 Resultados masa experimental para el dímero y tetramero por ESI-Cuadrupolo.	88
Tabla 10 Resumen de resultados masas ESI-QTOF para el dímero precursor y el tetramero. ....	90
Tabla 11 Resumen resultados masas MALDI-TOF para el dímero y el tetramero. ....	91
Tabla 12 Resumen de resultados linealidad método Karl Fischer. ....	97
Tabla 13 Resumen de resultados de Veracidad y Precisión para la determinación del contenido de agua por Karl Fischer. D2 = día 2. ....	99
Tabla 14 Resultados prueba t para cada nivel de masa junto con el intervalo de confianza al 95%. ....	100
Tabla 15 Resumen resultados aplicación del modelo lineal y cuadrático para el TFA a 195 nm. ....	105
Tabla 16. Resultados de repetibilidad instrumental para el TFA.....	109

---

Tabla 17 Resultados de repetibilidad del método y precisión intermedia inter-días para el TFA. ....	110
Tabla 18 Resultados de Exactitud de TFA expresado como porcentaje de recuperación de TFA subrogado en glicina.....	112
Tabla 19 Resultados del valor estimado de cada factor e interacción para el modelo cuadrático junto con el valor-p. ....	113
Tabla 20 Resumen resultados aplicación del modelo lineal y cuadrático para LfcinB (20-25) <sub>4</sub> a 210 nm. ....	121
Tabla 21 Resumen resultados normalidad y homocedasticidad de residuales para los modelos lineal y cuadrático para el ajuste de los datos de la curva de calibración del del tetramero LfcinB (20-25) <sub>4</sub> . ....	123
Tabla 22 Resumen resultados regresión lineal para el péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> y el L-Trp a 280 nm.....	124
Tabla 23 Resumen resultados normalidad y homocedasticidad de residuales para el péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> y el L-Trp a 280 nm. ....	125
Tabla 24. Resultados repetibilidad instrumental de L-Trp a 280 nm.....	126
Tabla 25 Resultados precisión del método de medición del péptido tetramérico LfcinB (20-25) <sub>4</sub> . ....	127
Tabla 26 Resultados del valor estimado de cada factor e interacción para el modelo cuadrático para el estudio de robustez del método de análisis del péptido LfcinB (20-25) <sub>4</sub> . ....	129

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Termino	Abreviatura	Siglas
Acetonitrilo	ACN	
Ácido 6-aminohexanoico	Ahx	
Análisis de la Varianza		ANOVA
Association of Analytical Communities		AOAC
American Type Culture Collection		ATCC
tert-Butyloxycarbonyl	Boc	
Carcinoma Ductal Infiltrante		CDI
Carcinoma Lobular Infiltrante		CLI
Correlation Spectroscopy		COSY
Diode Array Detector		DAD
N,N'-Diciclohexilcarbodiimida	DCC	
Diclorometano	DCM	
N,N-dimetilformamida	DMF	
Dimetilsulfóxido	DMSO	
Etanoditiol	EDT	
Environmental Protection Agency		EPA
Electrospray Ionization		ESI
Ácido fórmico	FA	
Food and Drug Administration		FDA
9-Fluorenilmetiloxicarbonilo	Fmoc	
Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography		HILIC
1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol	6-Cl-HOBt	

---

International Conference of Harmonization		ICH
International Electrotechnical Commission		IEC
International Standardization Organization		ISO
International Union of Pure and Applied Chemistry		IUPAC
Lactoferrina Bovina	LFB	
Lactoferricina Bovina	LfcinB	
Límite de Detección		LOD
Límite de Cuantificación		LOQ
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight		MALDI-TOF
Mililitro	mL	
Material de Referencia Certificado		MRC
Mass Spectrometry		MS
Organización Mundial de la salud		OMS
Péptidos anticancerígenos		PACs
Péptidos antimicrobianos		PAMs
Quadrupole – Time of Flight		QTOF
Resonancia Magnética Nuclear		RMN
Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography		RP-HPLC
Reversed-Phase Solid Phase Extraction		RP-SPE
Grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas		SAMP
Tiol	SH	
Solid Phase Peptide Synthesis		SPPS
System Suitability Test		SST
Tert-butilo	tBu	
Triisopropilsilano	TIS	

---

Ácido Trifluoroacético	TFA	
Tiempo de retención		tr
United States Pharmacopeia		USP
Ultravioleta		UV

---

# 1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, se estima que esta enfermedad en el 2020 provocó cerca de 10 millones de muertes, en el mundo una de cada seis muertes es debida al cáncer (1,2). El cáncer de mama es el tipo de cáncer más incidente entre las mujeres y también es la principal causa de muerte. Para el 2020 se reportaron cerca de 2,3 millones de nuevos casos de cáncer de mama y 685.000 muertes en el mundo fueron causadas por esta enfermedad (2).

En el grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP), como una estrategia para generar compuestos promisorios para el tratamiento de enfermedades, se han diseñado péptidos polivalentes usando la secuencia que corresponde al motivo mínimo de actividad antibacteriana reportada para la Lactoferricina Bovina (LfcinB (20-25): RRWQWR); se diseñaron y sintetizaron: un palíndromo, un dímero y un tetramero. También se sintetizaron un dímero y un tetramero derivado de la secuencia LfcinB (20-30): RRWQWRMCKLG. Estas moléculas polivalentes presentaron actividad antibacteriana contra cepas ATCC tanto Gram Positivas como Gram Negativas y esta actividad fue mayor que la presentada por la Lactoferricina Bovina (LfcinB) y la Lactoferrina Bovina (LFB) (3-5). Adicionalmente, los péptidos polivalentes LfcinB (20-25)<sub>2</sub>, LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, LfcinB (20-30)<sub>2</sub> y LfcinB (20-30)<sub>4</sub> presentaron significativo efecto citotóxico selectivo sobre las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MDA-MB-468 y MDA-MB-

231. Estos péptidos no mostraron actividad hemolítica ni efecto citotóxico significativo contra la línea celular derivada de fibroblastos epiteliales normales PCS 201-012, sugiriendo que estas moléculas presentan efecto citotóxico selectivo contra células derivadas del cáncer de mama (6).

Estos resultados son promisorios y es necesario evaluar con mayor profundidad la viabilidad sintética (y escalamiento) de los péptidos antes mencionados como posibles candidatos para el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer de mama. En el momento el grupo de investigación SAMP está ejecutando el proyecto *"Desarrollo de un medicamento contra el cáncer de mama basado en un péptido polivalente derivado de la LfcinB - Estudio de la fase preclínica (fase cero): caracterización fisicoquímica de un lote del fármaco para estudios pre-clínicos"* que es financiado por MINCIENCIAS (RC-706). En el desarrollo de este proyecto se han encontrado tres secuencias promisorias: el palíndromo LfcinB (21-25)<sub>pal</sub>: RWQWRWQWR; el dímero [<sup>26</sup>F]-LfcinB (20-30)<sub>2</sub>: (RRWQWRFKKLG)<sub>2</sub>K-Ahx y el tetramero LfcinB (20-25)<sub>4</sub>: ((RRWQWR)<sub>2</sub>)K-Ahx-C)<sub>2</sub>. Una etapa crucial en esta investigación es la caracterización fisicoquímica del péptido seleccionado como más promisorio. La caracterización fisicoquímica del péptido hace parte de la *fase cero* de los estudios preclínicos, esta fase involucra la implementación y validación de las metodologías analíticas que serán utilizadas para la caracterización del péptido con actividad promisorio, específicamente para este estudio se seleccionó el péptido polivalente LfcinB (20-25)<sub>4</sub>.

La validación de metodologías analíticas ha sido un campo de alto interés para la industria, para los entes reguladores y para la investigación. Cada ente regulador establece sus parámetros de validación y asimismo algunos sugieren el procedimiento más adecuado para llevar a cabo la validación. Por ejemplo, la USP en el capítulo <1225>, presenta la guía para la ejecución de la validación y en ella se

---

sugieren los parámetros: Exactitud, Precisión, Especificidad, LOD, LOQ. Linealidad, Rango y Robustez (7).

Se han reportado validaciones de metodologías para el análisis de moléculas peptídicas utilizando guías de diferentes entes reguladores, por ejemplo: (i) Se analizaron nueve péptidos considerados como drogas de abuso por medio de HILIC-DAD-MS, la técnica fue validada bajo los parámetros establecidos en la norma ISO/IEC 17025 siguiendo las guías individuales de la ISO; se enfatiza que se utilizó el detector de arreglo de diodos para el análisis de los péptidos de los cuales no se disponía de un material de referencia certificado (8). (ii) Se desarrolló y se validó una metodología para la cuantificación de dendrímeros en ensayos de permeación en la piel, no se especificó una guía o un ente regulador para la realización de la validación (9). (iii) El péptido CnAMP1, con actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*, se aplicó en líneas celulares de intestino humano cultivadas y para determinar su estabilidad sobre estas células se desarrolló y validó una metodología por RP-HPLC siguiendo los lineamientos de validación de la FDA para métodos bioanalíticos (10). (iv) Para el análisis del péptido GSE4 encapsulado en nanopartículas de PEI-PLGA se desarrolló y validó una metodología por HPLC con detector de fluorescencia bajo los lineamientos de validación de la ICH (11).

Es importante tener en cuenta que, si bien existe literatura que reporta validaciones de metodologías para determinar el contenido de péptidos por HPLC, estas no pueden ser tomadas como guía general debido a que el péptido polivalente LfcinB (20-25)<sub>4</sub> es de naturaleza única y se requiere validar la metodología para su cuantificación por cromatografía RP-HPLC.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Antecedentes**

#### **2.1.1 Péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana y citotóxica**

El cáncer es el proceso por el cual las células pierden el control de su capacidad proliferativa, provocando el crecimiento descontrolado de las células, resultando en la formación de tumores y posterior diseminación de células cancerosas a otras partes del cuerpo para formar nuevos tumores (metástasis). Las causas de esta enfermedad están relacionadas con factores genéticos y exposición a agentes como: i) radiación ionizante, ii) químicos (asbesto, humo de tabaco, arsénico, compuestos orgánicos, etc.) iii) biológicos (microorganismos patógenos); el envejecimiento y malos hábitos de vida como obesidad y sedentarismo aumentan el riesgo de adquirir esta enfermedad (1). Dentro de este contexto, el cáncer de mama es el más incidente entre las mujeres; existen dos tipos de cáncer de mama: el carcinoma ductal infiltrante (CDI) y el carcinoma lobular infiltrante (CLI). El CDI es el más común y representa entre el 80 y 90% de los cánceres de mama diagnosticados, se presenta en los conductos ductales que transportan la leche materna desde los lóbulos al pezón. El CLI se diagnostica entre un 10% y 12% y se desarrolla en los

lóbulos donde se produce la leche materna (12). Actualmente, se buscan nuevas alternativas para combatir el cáncer debido a que los medicamentos y tratamientos aplicados típicamente son agresivos, de baja selectividad y altamente invasivos, afectando significativamente la calidad de vida de los pacientes. Los péptidos antimicrobianos (PAMs), son una fuente de nuevas moléculas con actividad anticancerígena. los PAMs constituyen un mecanismo primario de defensa en diferentes tipos de células contra infecciones causadas por bacterias y otros agentes externos (13). Los PAMs poseen amplio espectro de acción (14) contra bacterias (gram positivas y gram negativas), hongos, virus, entre otros. La estructura primaria de los PAMs está constituida principalmente por aminoácidos catiónicos que le confieren mayor interacción con las cargas negativas de la membrana externa de las bacterias; la interacción electrostática conlleva a la desestabilización de la membrana causando la lisis celular (5,14).

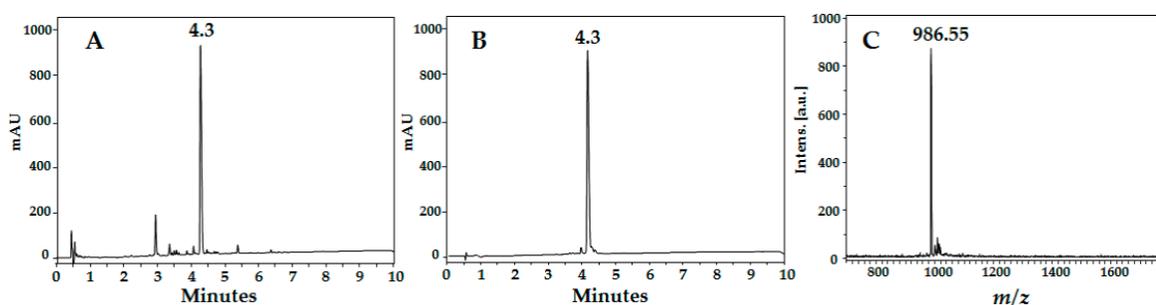
Muchos PAMs han mostrado también actividad anticancerígena, generándose así un amplio campo de investigación; estas moléculas reciben el nombre de Péptidos Anticancerígenos (PACs) (15–18). La Lactoferrina Bovina (LFB), ha sido fuente de varios péptidos antibacterianos y anticancerígenos. La LFB es una glicoproteína de 703 aminoácidos con peso molecular de 80 kDa, perteneciente a la familia de las transferrinas (proteínas transportadoras de hierro), se encuentra en su forma libre de hierro en fluidos corporales tales como: secreciones de las mucosas, líquido seminal, leche materna, entre otras (19,20). La Lactoferricina Bovina (LfcinB: <sup>17</sup>FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF<sup>41</sup>) es generada por la hidrólisis de la LFB mediada por pepsina gástrica (19). La LfcinB y fragmentos más cortos derivados de este péptido han presentado mayor o igual actividad antibacteriana que la LFB; se ha identificado el motivo mínimo de actividad antibacteriana, correspondiente a LfcinB (20-25): <sup>20</sup>RRWQWR<sup>25</sup> (21).

Péptidos derivados de la LfcinB han mostrado actividad citotóxica selectiva contra líneas celulares derivadas de cáncer de mama (6,22). Específicamente, se ha encontrado que los péptidos: palíndromo, LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>: RWQWRWQWR, dímero [<sup>26</sup>F]-LfcinB (20-30)<sub>2</sub>: (RRWQWRFKKLG)<sub>2</sub>-K-Ahx y tetramero (doble dímero) LfcinB (20-25)<sub>4</sub>: ((RRWQWR)<sub>2</sub>K-Ahx-C)<sub>2</sub>, presentan actividad citotóxica contra las líneas derivadas de cáncer de mama, HTB-132, MCF-7 y MDA-MB 231. Los tres presentan efecto dependiente de la concentración, rápido (menos de 90 minutos) y que se mantuvo hasta 48 h después de una sola dosis administrada. Además, se observó que estos péptidos no afectan la viabilidad celular del cultivo primario de fibroblastos, trofoblastos o la línea no tumorigénica MCF-12, lo que podría indicar que su efecto es selectivo para células cancerosas. Por otro lado, Mediante citometría de flujo se encontró que el tipo de muerte celular generada por estos péptidos se da principalmente por eventos de apoptosis (6,15,17,22).

Estas tres moléculas son promisorias para el tratamiento del cáncer de mama y han sido obtenidas mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), que consiste en unir covalentemente el aminoácido del extremo C-terminal de la secuencia a un soporte sólido insoluble y construir la cadena con la incorporación de los aminoácidos a través de pasos sucesivos de cada aminoácido protegido; luego de que se han unido los aminoácidos de la secuencia deseada, se realiza la desprotección de los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos y el desanclaje (separación) del péptido del soporte sólido (23,24). Esta estrategia permite obtener péptidos lineales y ramificados a los cuales se les pueden unir aminoácidos no naturales o motivos orgánicos que aumentan su estabilidad o potencial terapéutico (25). Uno de los pasos más importantes en el proceso de obtención de una molécula peptídica es la caracterización de las moléculas por técnicas analíticas.

## 2.1.2 Caracterización de péptidos sintéticos

La caracterización de moléculas peptídicas sintéticas consta de cuatro etapas: (i) el análisis por RP-HPLC del producto de síntesis crudo, (ii) purificación del péptido por HPLC preparativa o por SPE, generalmente en fase reversa (RP), (iii) análisis del producto puro por RP-HPLC y (iv) análisis por espectrometría de masas, MALDI-TOF o ESI. A manera de ejemplo, se muestra la caracterización del péptido LfcinB (20-25) reportado en (6), Figura 1.



**Figura 1.** Caracterización del péptido LfcinB (20-25). Análisis por RP HPLC: A) Perfil cromatográfico del producto crudo, B) Perfil cromatográfico del del producto purificado por RP-SPE. Análisis por espectrometría de masas: C) Espectro MALDI-TOF del péptido puro, la señal corresponde a la especie  $[M+H]^+$ .

En trabajos previos publicados por el grupo SAMP, los péptidos sintéticos derivados de la LfcinB han sido analizados por RP-HPLC, específicamente, León *et al.* en el año 2015 reportó un método utilizando una columna empacada Agilent Eclipse XDB-C18 (150mm, 3,5  $\mu$ m, 4,6  $\times$  150 cm) con elución por gradiente lineal del 5% al 70 % de solvente B (acetonitrilo – TFA 0,05%) en solvente A (Agua – TFA 0,05%) usando como tiempo de gradiente ( $t_G$ ) 45 min con flujo 1,0 mL/min obteniendo un  $t_R$  de 20,00 min para el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> (5). Huertas *et al.* en el año 2017 mejoró este método cambiando la columna empacada por una columna monolítica Merck Chromolith HighResolution RP-18e (4,6  $\times$  50 cm), utilizando un

gradiente lineal del 5% al 70 %B en 11.5 min con flujo 2,0 mL/min, aunque no reporta el  $t_R$  para el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, se obtuvieron  $t_R$  entre 4,0 y 6,0 min para péptidos derivados de la LfcinB (3). En un estudio posterior, Vargas *et al.* reportó el análisis de LfcinB (20-25)<sub>4</sub> usando el método de Huertas, en este estudio se muestra la oxidación del dímero precursor y el seguimiento de la reacción por RP-HPLC que conduce a la formación de la estructura tetramérica (6); el  $t_R$  del tetramero fue 5,6 min. Insuasty *et al.* en el año 2019 utilizó también la columna monolítica empleada por Huertas, pero cambió el gradiente que fue de 5% al 50 %B en 8 min, obteniendo  $t_R$  similares a los reportados por Huertas (26). Este desarrollo en el método de análisis permitió entonces reducir los tiempos de análisis y el consumo del solvente significativamente.

En el presente trabajo se validó la metodología para la cuantificación del péptido tetramérico LfcinB (20-25)<sub>4</sub> por cromatografía por RP-HPLC utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD).

### **2.1.3 Validación de metodologías analíticas**

La validación es definida por la FDA como el proceso de demostrar que un procedimiento analítico es adecuado para su uso intencionado (27); por otro lado, es definida por la USP como el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requerimientos para las aplicaciones analíticas intencionadas (7). La metodología y el objetivo de los procedimientos analíticos deben estar claramente definidos antes de iniciar la validación, se debe entonces realizar estudios previos del desarrollo y optimización del método a ser validado (27). Dentro de las ventajas que tiene realizar una validación se encuentran (28):

- Demostrar que los métodos son adecuados para los análisis propuestos en las condiciones descritas.
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados obtenidos, lo cual a su vez minimizará el número de fallos y repeticiones, disminuyendo así los costos implicados en el análisis.
- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias de los entes reguladores, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del análisis.
- Permite la transferencia de métodos analíticos.

No todos los métodos analíticos tienen que ser validados, métodos estandarizados (como aquellos que son reportados por la AOAC, USP o ISO) no tienen que ser validados si se siguen estrictamente tal como son establecidos, tendrán únicamente que ser verificados por el laboratorio que decida implementar los métodos. Cualquier variación sobre estos métodos requerirá entonces de una validación completa (29). Para realizar una validación de una metodología se requiere del cumplimiento de los parámetros de validación, junto con el soporte estadístico pertinente. Aunque estos parámetros pueden variar según el ente regulador que los establezca, teniendo en cuenta el tipo de análisis y el nivel de concentración del analito, de forma general se pueden enmarcar los siguientes (7,30,31):

- **Especificidad/Selectividad:** La especificidad es definida por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) como la habilidad de analizar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes que puedan estar presente, típicamente estos pueden ser impurezas, degradantes, matriz, etc. (30) Sin embargo, esta definición es preferida como “selectividad” por la IUPAC y la “especificidad” se refiere a procedimientos que son 100% selectivos para el analito de interés (7).

- **Exactitud:** Expresa la cercanía o concordancia entre el valor verdadero o de referencia y el valor medido. La exactitud se estudia como dos componentes: veracidad y precisión (31,32).
- **Veracidad:** Hace referencia a la proximidad entre el valor medio de un número de valores medidos repetidos y un valor aceptado como referencia (32,33).
- **Precisión:** Expresa la cercanía o concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas de múltiples tomas de la muestra. La precisión se considera en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. *Repetibilidad:* Expresa la precisión bajo las mismas condiciones operacionales en un intervalo corto de tiempo. La repetibilidad es también llamada precisión intra-ensayo. *Precisión intermedia:* Expresa variaciones de los resultados cuando las mediciones se realizan dentro del mismo laboratorio al medir la misma muestra pero en diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. (31) *Reproducibilidad:* Expresa la precisión entre laboratorios diferentes (estudios colaborativos, normalmente aplicados a la estandarización de la metodología)
- **Límite de detección (LOD):** Es la mínima cantidad de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con exactitud.
- **Límite de cuantificación (LOQ):** Es la mínima cantidad de analito que puede ser cuantitativamente determinada con la precisión y veracidad adecuada. El límite de cuantificación es un parámetro de ensayos cuantitativos para bajos niveles de concentración en una muestra y es usada particularmente para determinación de impurezas o productos de degradación.
- **Linealidad:** Es la habilidad de obtener resultados que son proporcionales (directamente o por medio de una transformación matemática bien definida) a la concentración del analito en una muestra dentro de un rango dado.

- **Intervalo:** Hace referencia a las concentraciones de analito comprendidas entre un nivel inferior y uno superior. En los métodos analíticos se pueden encontrar intervalos: de trabajo, dinámico y lineal. Cuando se hace referencia al intervalo lineal, además de lo mencionado anteriormente, en este intervalo se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de exactitud (precisión y veracidad) y linealidad (31,32).
- **Robustez:** Es una medida de su capacidad a permanecer inalterable por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y da indicio de la confiabilidad de su uso rutinario.

La aplicabilidad de los parámetros de validación depende de la necesidad del análisis que se requiera. La ICH reporta los parámetros que se aplican para cada caso (Tabla 1). La validación del método, para la cuantificación por cromatografía RP-HPLC, requiere de los siguientes parámetros: Exactitud como Veracidad y Precisión (Repetibilidad y Precisión intermedia), Selectividad, Linealidad e Intervalo lineal. En este trabajo se evaluaron estos parámetros para la validación del método de determinación del contenido del péptido polivalente LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, en un lote de materia prima, por cromatografía RP-HPLC.

**Tabla 1** Elementos requeridos para la validación de metodologías analíticas.

Parámetro	Identificación	Impurezas		Contenido
		Cuantitativo	Test límite	
Exactitud	No	Si	No	Si
Precisión:	Si	Si		Si
✓ Repetibilidad	No	Si	No	Si
✓ Precisión intermedia	No	Si	No	Si
Selectividad	Si	Si	Si	Si
LOD	No	No	Si	No
LOQ	No	Si	No	No
Linealidad	No	Si	No	Si
Rango	No	Si	No	Si

## 2.2 Planteamiento del problema

El cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia en las mujeres a nivel mundial, con cifras del 43,5% a nivel mundial y 44,1% en Colombia (34); también es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (15,0 %) seguido del cáncer de pulmón (13,8%) (35). Es de gran importancia el desarrollo de agentes terapéuticos eficaces para el control del cáncer de mama, que sean menos invasivos y económicos para asegurar una mayor cobertura.

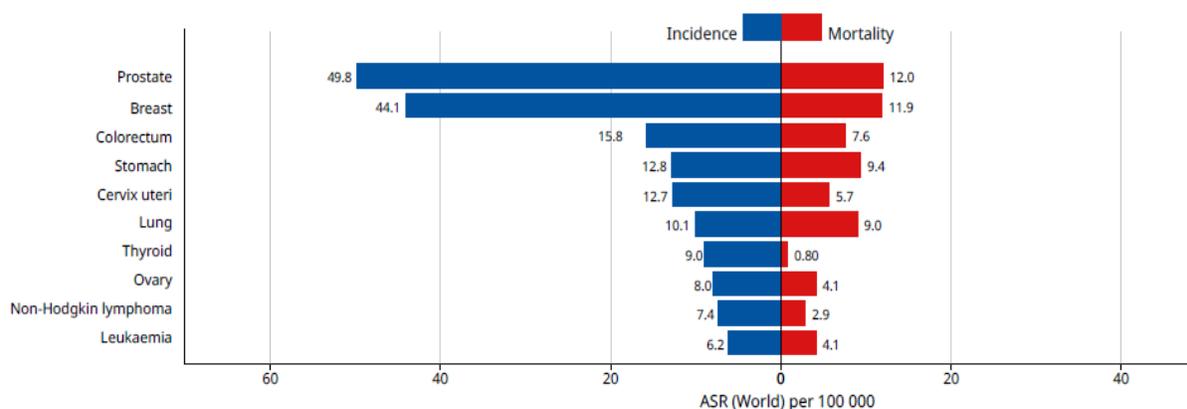


Figura 2. Tasa de incidencia y mortalidad en Colombia para los 10 tipos de cáncer más prevalentes.

Tomado de (36).

Actualmente, el grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas ha encontrado tres moléculas con actividad citotóxica contra las líneas derivadas de cáncer de mama, que las hace promisorias: LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>: RWQWRWQWR, [<sup>26</sup>F]-LfcinB (20-30)<sub>2</sub>: (RRWQWRFKKLG)<sub>2</sub>-K-Ahx y el tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub>: ((RRWQWR)<sub>2</sub>K-Ahx-C)<sub>2</sub>. Para la *fase cero* de estudios pre-clínicos es necesaria la caracterización fisicoquímica del lote de fármaco, para continuar a ensayos *in vitro* e *in vivo*, también enmarcados dentro de esta fase pre-clínica (37,38). Para esta fase es entonces pertinente la validación de algunas de las técnicas analíticas utilizadas para caracterizar los péptidos. Sintéticamente, el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> presenta un mayor reto al tener un paso de oxidación en solución

para la formación de la estructura tetramérica; esta molécula se seleccionó para el presente estudio.

De acuerdo con la problemática mencionada se planteó como pregunta de investigación:

**¿Las técnicas HPLC, RMN y MS se pueden utilizar para la caracterización fisicoquímica de un lote de péptido polivalente LfcinB (20-25)<sub>4</sub> candidato a fármaco para el tratamiento del cáncer de mama?**

### 3. Hipótesis

La caracterización fisicoquímica de un lote del péptido polivalente LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, obtenido por SPPS-Fmoc/tBu , es posible al emplear las técnicas HPLC, RMN y MS, debido a que estas permiten determinar el contenido del fármaco y su identificación inequívoca.

---

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo General:

Caracterizar fisicoquímicamente un lote de 100 mg del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>: ((RRWQWR)<sub>2</sub>-K-*Ahx*-C)<sub>2</sub> por las técnicas recomendadas por la guía CDER-FDA

### 4.2 Objetivos Específicos:

- Obtener un lote de 100 mg del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> por síntesis en fase sólida usando la estrategia Fmoc/tBu.
- Caracterizar el péptido en el lote, usando cromatografía líquida (RP-HPLC-DAD), Resonancia magnética nuclear (1D-2D) y Espectrometría de masas (MALDI-TOF, ESI).
- Validar la metodología de cuantificación del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> por RP-HPLC-DAD. Validar la metodología de cuantificación del contraión por cromatografía.
- Cuantificar el contenido del péptido, la humedad y el contraión en el lote utilizando las técnicas de cromatografía HPLC-DAD y Karl Fischer.

## 5. Metodología

### 5.1 Síntesis de LfinB (20-25)<sub>4</sub> mediante SPPS- Fmoc/tBu

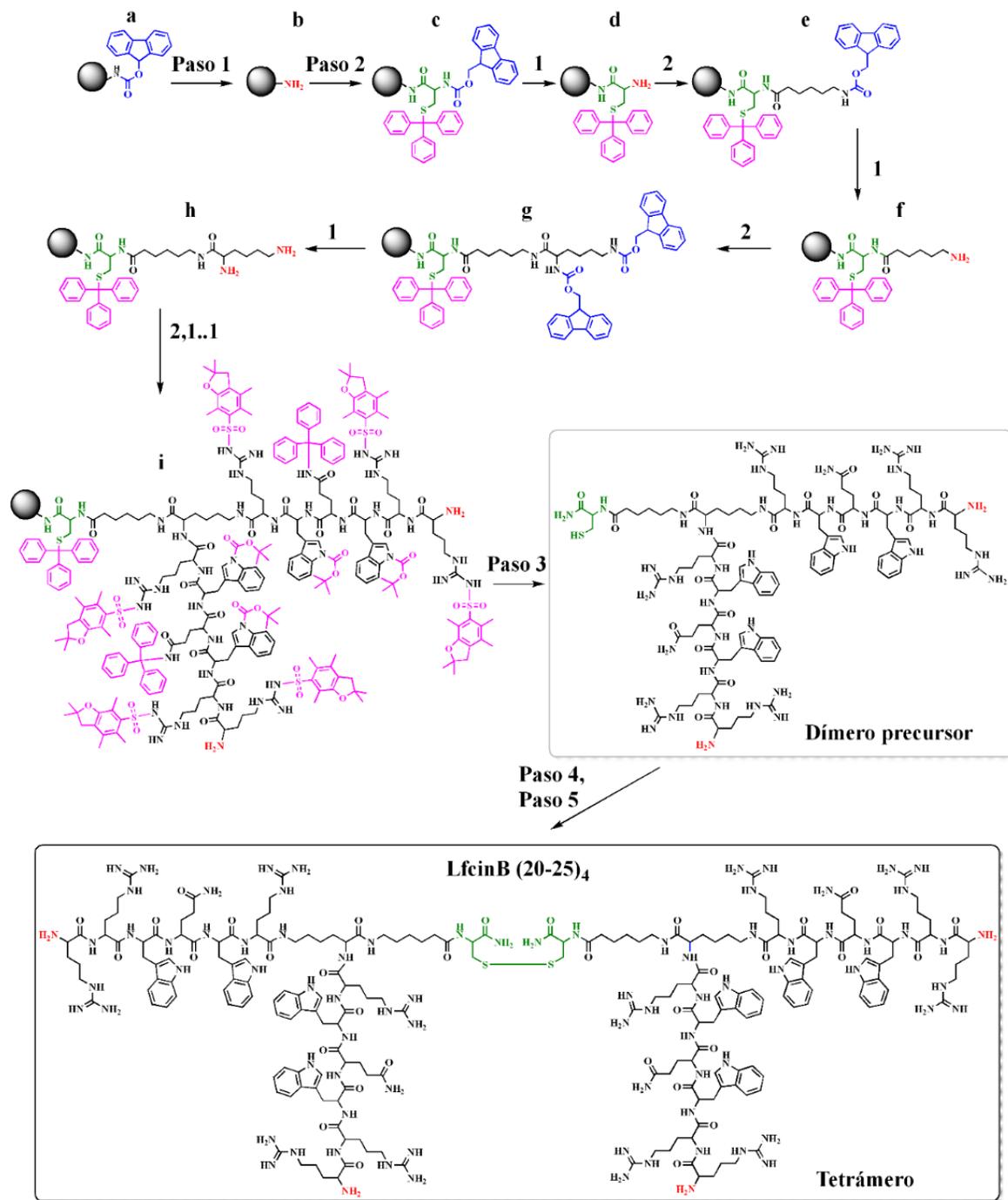


Figura 3. Esquema de la síntesis del tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub>.

La síntesis del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> consta de cinco pasos (Figura 3): 1) remoción del grupo protector Fmoc, 2) reacción de acople de los aminoácidos, 3) clivaje, 4) purificación del dímero por SPE y 5) oxidación del dímero puro para la obtención del tetrámero. A continuación, se describe el detalle de cada paso.

### **5.1.1 Acondicionamiento de la resina (Paso 1, Figura 3)**

El procedimiento inició con el hinchamiento de la resina Rink Amida (0.46 meq/g) por tratamiento con DMF y DCM. Luego, los grupos amino en la resina fueron desprotegidos por tratamiento con 4-metilpiperidina 5% en DMF (2×10 min). La resina fue posteriormente lavada exhaustivamente con DMF (5×) y DCM (5×), Figura 3a-b.

### **5.1.2 Reacción de unión de los aminoácidos a la resina (Paso 2, Figura 3)**

Para el paso de acople o unión de los aminoácidos protegidos a la resina, los Fmoc-aminoácidos (1,15 mmol) fueron pre activados con DCC/6-Cl-HOBt (1,14/1,15 mmol) en DMF por 15 min en agitación constante. El Fmoc-aminoácido activado se mezcló con la resina desprotegida y lavada. La reacción se dejó por 2 h con agitación. Posteriormente, la resina fue lavada con DMF (3×) y DCM (2×). Los pasos de desprotección y acople se repitieron hasta tener la secuencia deseada, cada paso en la síntesis fue monitoreado por el test de Kaiser (ensayo de ninhidrina).

La cisteína protegida (Fmoc-Cys(Trt)-OH) es el primer aminoácido que se unió la resina (Figura 3c), este residuo es fundamental para la formación del tetrámero por oxidación. Una vez es removido el grupo Fmoc de la Cys (Figura 3d) se unió el aminoácido Fmoc- 6-aminohexanóico (Ahx) como molécula espaciadora (Figura 3e-

f), posteriormente se incorporó el aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (Figura 3g-h) para la síntesis del dímero precursor siguiendo la estrategia “Multiple Antigen Peptides” (MAPs), que consiste en la incorporación simultánea de los aminoácidos por los extremos  $\alpha$ -amino y  $\epsilon$ -amino hasta unir los aminoácidos de la secuencia generando una estructura dimérica protegida en sus cadenas laterales (Figura 3i).

### **5.1.3 Desprotección de las cadenas laterales y desanclaje del péptido de la resina (Paso 3, Figura 3)**

El paso de clivaje, que consiste en la remoción del soporte sólido y los grupos protectores de las cadenas laterales, se realizó utilizando un cóctel que contenía TFA/Agua/TIS/EDT (93/2/2,5/2,5 % v/v), esta reacción se dejó por 12 h, la mezcla fue después filtrada y se recolectó el filtrado, en el cual el péptido fue precipitado por adición de éter etílico; el dímero precursor crudo se lavó con éter (5 $\times$ ). se secó y se analizó por RP-HPLC.

### **5.1.4 Purificación por SPE (Paso 4, Figura 3)**

Para la purificación del dímero precursor, por RP-SPE, se siguió el protocolo reportado en (26); brevemente: a partir del tiempo de retención obtenido del perfil cromatográfico del dímero crudo y basados en la ecuación [1], se calculó el %B en el cual el péptido eluye, que es el porcentaje en el cual se esperaba la elución por SPE. A partir de esto se diseñó un programa para la elución por gradiente escalonado para SPE. En la ecuación [1] %B<sub>e</sub> es el %B de elución,  $t'_R = t_R - (T_{\text{delay}} + t_0 + t_D)$ ,  $t_G$  es el tiempo de gradiente y %B<sub>i</sub> es el %B inicial en el gradiente.

$$\%B_e = t'_R \times \left(\frac{\Delta B}{t_G}\right) + \%B_i \quad [1]$$

### 5.1.5 Formación del tetrámero (Paso 5, Figura 3)

Para la formación del tetrámero se oxidó el dímero precursor puro y la reacción fue monitoreada por RP-HPLC. Brevemente, el dímero puro fue disuelto en agua desionizada, luego el pH fue ajustado a 8,0 con bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), la reacción de oxidación se dejó a temperatura ambiente y agitación constante hasta que la señal correspondiente a la especie de partida (en el perfil cromatográfico) desapareció

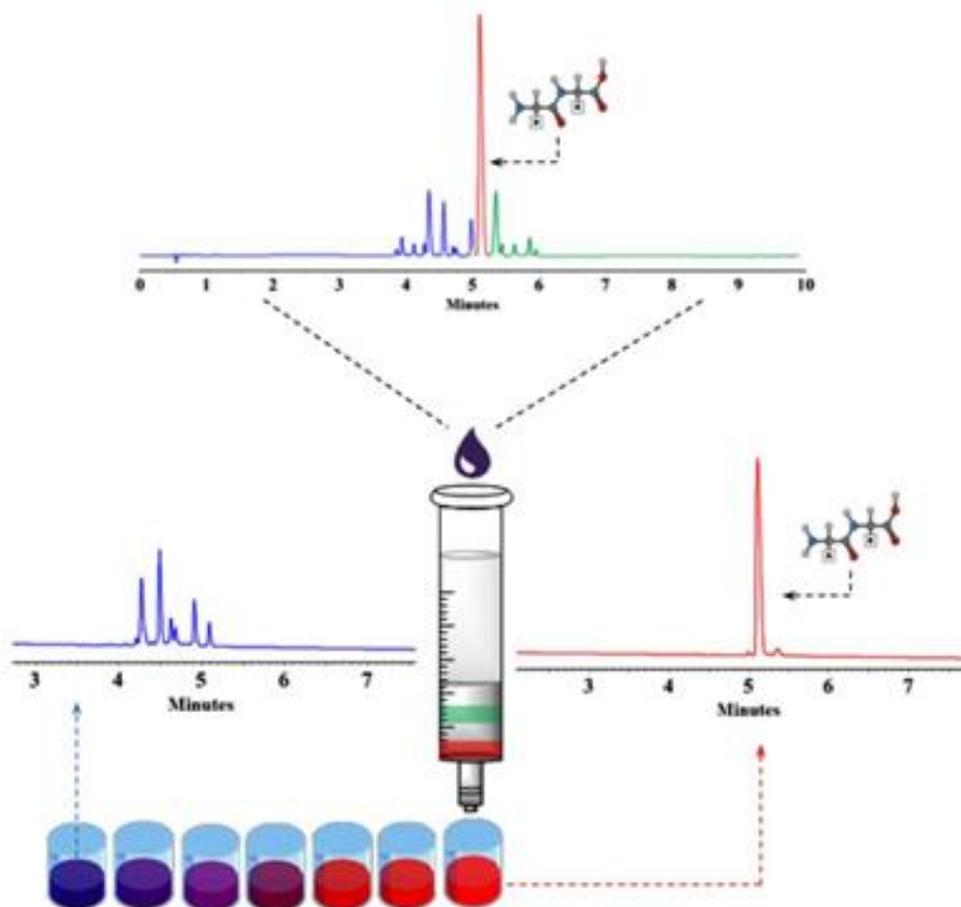


Figura 4. Esquema de la purificación de péptidos por RP-SPE, tomado de (26)

## 5.2 Análisis de péptidos por RP-HPLC – Fase exploratoria:

La caracterización de péptidos por RP-HPLC se realizó empleando el método cromatográfico reportado por el grupo SAMP (3), descrito a continuación:

- Fase móvil: Agua – TFA 0,05% (solvente A), Acetonitrilo – TFA 0,05% (solvente B)
- Inyección: 10  $\mu$ L
- Flujo: 2,0 mL/min
- Temperatura: ambiente
- Gradiente de elución: 5/5/70/100/100/5/5 %B en 0/1/12,5/12,6/15,6/15,7/19 min

Este método fue evaluado para comprobar si era adecuado para ser validado o si requería una optimización basada en la ecuación del factor de retención en el gradiente ( $k^*$ ), ecuación [2], donde  $t_G$  es el tiempo de gradiente,  $F$  es el flujo en mL/min,  $V_m$  es el volumen muerto,  $\Delta\Phi$  es la diferencia del gradiente y  $S$  es una constante que depende del peso molecular de los analitos.

$$k^* = \frac{0.87t_GF}{V_m\Delta\Phi S} \quad [2]$$

En este trabajo se utilizó un equipo HPLC PRIMAIDE (HITACHI) con detector DAD calificado por el proveedor.

## 5.3 Análisis de péptidos por espectrometría de masas

### 5.3.1. MALDI-TOF

El análisis de los péptidos por MALDI-TOF se realizó en un espectrómetro de masas MicroFlex-TOF, se empleó el ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (1 mg/mL) como matriz; Láser: 200 disparos y 25-30% de potencia.

### 5.3.2. ESI-Cuadrupolo

El análisis por ESI-Cuadrupolo se realizó en un equipo SCIEX QTRAP 4500, inyectadas por infusión directa (0,1 mg/mL). Las condiciones del análisis fueron: fuente: Electrospray, gas cortina (CUR): 20, voltaje Electrospray (IS): 4500, temperatura (TEM): 150, ion source gas 1-2: 20, potencial declustering (DP): 146, potencial de entrada (EP): 10, cuadrupolo energía del ion 1 (IEI) 0,8, CEM: 2200, polaridad: modo positivo, rango de masas: 0-1600 m/z.

### 5.3.3. LC-MS ESI-QTOF

Los análisis de ESI-QTOF se realizaron en un equipo BRUKER Impact II con fuente Electrospray y en modo LC-MS. Las condiciones cromatográficas fueron: columna: Bruker Intesity Solo 2 C18 (100 x 2,1 mm i.d.), temperatura de horno de columna: 30°C, solvente A: Agua-FA 0,1%, solvente B: ACN-FA 0,1%. Programa de elución: gradiente 5-95% B en 10 min. Las condiciones MS fueron: end plate offset: 500 V, capilar: 4500 V, nebulizador: 1.8 Bar, gas de secado: 8,0 L/min, temperatura de secado: 220 °C, cuadrupolo energía del ion: 5,0 eV, modo de adquisición: Auto MS/MS, polaridad: modo positivo, rango de masas: 20-1000 m/z.

### 5.4. Análisis del dímero precursor y el tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub> por RMN

Los espectros de RMN se obtuvieron de un espectrómetro BRUKER Avance 400 operando a 400,131 MHz para RMN-<sup>1</sup>H. Los desplazamientos químicos se reportaron en ppm utilizando la señal del disolvente como referencia.

## 5.5. Plan de Validación

Las validaciones se realizaron de acuerdo con los lineamientos de la USP (7). El plan de validación para cada parámetro y analito en la muestra se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2** Plan de validación para los analitos evaluados en el producto de síntesis del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>.

Parámetro	Karl Fischer	TFA	Péptido
Selectividad	<p>Demostración de diferencias significativas entre el contenido de agua del blanco respecto al contenido del agua del péptido</p> <p>6 determinaciones del blanco y del péptido</p> <p>Blanco: Metanol grado LC-MS</p> <p>Evaluación de la diferencia entre las medidas del blanco y el péptido por prueba t a dos colas (<math>p = 0,10</math>)</p>	<p>Pureza del pico DAD</p> <p>Capacidad del método de la separación del TFA de molécula de estructura similar (ácido acético)</p>	<p>Pureza del pico DAD</p> <p>Capacidad del método de la separación del analito de sus impurezas obtenidas del proceso de purificación</p> <p>Muestra: solución del péptido puro enriquecida con impurezas (subproductos de síntesis)</p> <p>Se revisó que la respuesta cromatográfica para evaluar que no se presentan señales en el tiempo de retención del péptido (DAD y MS)</p>
Preliminar Intervalo lineal	<p>Evaluación de 7 niveles de masa utilizando altas y bajas concentraciones de agua (estándar de agua 0,01% y 1%)</p>	<p>Determinación de:</p> <p>Intervalo lineal</p> <p>Intervalo dinámico</p> <p>Punto de saturación</p> <p>Evaluación de 5 Puntos</p>	<p>Determinación de:</p> <p>Intervalo lineal</p> <p>Intervalo dinámico</p> <p>Evaluación de 4 Puntos</p>

Parámetro	Karl Fischer	TFA	Péptido
Intervalo lineal	<p>Evaluación del sistema de medición Karl Fischer empleando al menos 7 niveles de masa</p> <p>Graficado como <math>\mu\text{g}</math> de agua medidos vs <math>\mu\text{g}</math> de agua adicionados (recalculados con estándar de agua)</p>	<p>Evaluación de la linealidad por una curva de calibración con 7 niveles equidistantes, en un intervalo definido según estudio preliminar</p> <p>Control de calidad: Solución de TFA 0,15 mg/g</p> <p>5 lecturas por nivel de concentración (nivel dispensado en 5 viales diferentes)</p>	<p>Evaluación de la linealidad por una curva de calibración con 7 niveles equidistantes, en un intervalo definido según estudio preliminar</p> <p>Control de calidad: solución de cafeína</p> <p>5 lecturas por nivel de concentración (nivel dispensado en 5 viales diferentes)</p>
Precisión – repetibilidad	<p>Se evaluó con la medida de 6 repeticiones del estándar de agua 1% en 3 niveles de masa y estándar de agua 0,01% en la misma masa 6 repeticiones</p> <p>Para intentar replicar lo mejor posible la masa adicionada se realizó conteo de gotas.</p>	<p>Repetibilidad instrumental: 5 réplicas de solución de TFA en 3 niveles de concentración, obtenida de datos de Linealidad</p> <p>Repetibilidad del método: evaluada con 5 réplicas del péptido crudo y péptido puro más 5 preparaciones de solución de TFA a una concentración cercana a la del péptido puro</p>	<p>Repetibilidad instrumental: 5 réplicas de solución del péptido en 3 niveles de concentración, obtenida de datos de Linealidad</p> <p>Repetibilidad del método: Liofilización de 20 mg del péptido, recién liofilizado se pesó 5 veces y se analizó el mismo día</p>
Precisión intermedia – interdías	<p>Mediciones en dos días diferentes a una concentración donde la repetibilidad sea mejor (menor CV, estándar de agua 1%)</p>	<p>Mediciones a dos días diferentes, se sigue el procedimiento de preparación como fue descrito para la repetibilidad del método</p> <p>3 muestras: péptido crudo, péptido puro, solución de TFA</p>	<p>Mediciones a dos días diferentes, se sigue el procedimiento de preparación como fue descrito para la repetibilidad del método</p>

Parámetro	Karl Fischer	TFA	Péptido
Sesgo	Calculado respecto al estándar de agua 0,01% y 1%	<p>Evaluado como "% de recuperación"</p> <p>Obtenido por el % de recuperación del TFA subrogado en un compuesto capaz de formar pares iónicos con el TFA. Se seleccionó la glicina como compuesto para ser subrogado</p> <p>Se enriqueció la glicina (3,77 mg/g) con TFA (1,99 mg/g) y a partir de esta solución se prepararon 3 niveles de concentración respecto a la concentración de TFA</p>	No se evaluó, no hay MRC
Límite de detección – LOD	No se evaluó	<p>Evaluado por curva de calibración a bajas concentraciones</p> <p>5 niveles de concentración</p> <p>Determinado como:  <math>LOD = 3,3 * S_b / a</math></p>	No se evaluó
Límite de cuantificación - LOQ	Se asume como el nivel más bajo del intervalo lineal	<p>Evaluado por curva de calibración a bajas concentraciones</p> <p>5 niveles de concentración</p> <p>Determinado como:  <math>LOQ = 10 * S_b / a</math></p> <p>Como no se evaluó la precisión y el sesgo en esta concentración, se asume el LOQ como el nivel más bajo de la curva de calibración</p>	Se asume como el nivel más bajo del intervalo lineal

Parámetro	Karl Fischer	TFA	Péptido
Robustez	<p>Se seleccionaron los factores:</p> <p>1) Velocidad de agitación 2) Tiempo de mezcla 3) Cantidad de muestra adicionada</p> <p>Evaluado por arreglo factorial 2<sup>3</sup></p>	<p>Se seleccionaron 3 factores que puedan afectar los experimentos</p> <p>1) Fuerza iónica de la fase móvil (mM) 2) Flujo (mL/min) 3) Longitud de onda (nm)</p> <p>Se evaluó por arreglo factorial 3<sup>3</sup> con 7 medidas del punto central. La visualización de datos se realizó por la metodología de superficies de respuesta.</p>	<p>Se seleccionaron 3 factores que puedan afectar los experimentos</p> <p>1) % de TFA en la fase móvil 2) Flujo (mL/min) 3) Longitud de onda (nm)</p> <p>Se evaluó por arreglo factorial 3<sup>3</sup> con 7 medidas del punto central. La visualización de datos se realizó por la metodología de superficies de respuesta.</p>

Las particularidades para cada parámetro de validación y las metodologías empleadas son aclaradas a continuación:

### 5.5.1. Descripción de metodologías validadas

#### 5.5.1.1 Karl Fischer

Para la determinación de la humedad por Karl Fischer se empleó el método de la USP <921> “Determinación de Agua” (7). El método requiere el reactivo de Karl Fischer que consiste en una mezcla de yodo y dióxido de azufre disueltos en piridina y metanol, aunque por su alta toxicidad y mal olor, la piridina ha sido sustituida por otras bases como el imidazol, ya que la función de la piridina es

actuar como buffer y no interviene directamente en la cinética de la reacción de titulación. Las reacciones de la titulación son:



En el método de Karl Fischer coulombimétrico, el  $I_2$  se produce en el electrodo generador de Pt, sobre la superficie del electrodo se genera  $H_2$  mientras que el  $I^-$  de la solución se oxida a  $I_2$ . Las reacciones de oxidación y reducción son:



Instrumental/Materiales y métodos: Se utilizó un equipo de Karl Fischer Metrohm Titrand 852 con celda coulombimétrica sin diafragma y un computador con el Software Tiamo 2.5. Las condiciones del instrumento fueron:  $I(\text{pol})$ : 10  $\mu\text{A}$ , corriente electrodo generador: 100 mA, velocidad de agitación: 4, punto final: a 50.0 mV, criterio de punto final: deriva relativa a 5  $\mu\text{g}/\text{min}$ , deriva de inicio: <15  $\mu\text{g}/\text{min}$ , corrección de deriva: automática. Las mediciones de masa se realizaron en una balanza analítica Mettler Toledo XPE 204. Se emplearon jeringas de plástico de 5 mL para la adición de la muestra. Como reactivos se empleó CombiCoulomat fritless 100 mL, Materiales de Referencia Certificados (MRC) HYDRANAL 1% y 0,01% y metanol grado LC-MS como blanco. La muestra del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> se preparó pesando 20 mg del péptido en 2,0 mL de metanol para obtener una solución 10 mg/mL.

*Procedimiento experimental:* (i) Equilibrio de la celda y lecturas de sacrificio Antes de iniciar a trabajar con el equipo la celda se equilibró por 1 hora. Posterior a ese tiempo se realizaron "lecturas de sacrificio", que consisten en el consumo del agua en el aire dentro de la cámara, para ello, se inició la titulación en el software y se

agitó cuidadosamente la celda con la mano, este procedimiento se repitió hasta obtener menos de 10 µg de agua en la lectura del agua y se repitió cada 3 mediciones de blancos o muestras. (ii) Medición de muestras:

La muestra líquida (blanco, MRC o péptido disuelto en metanol) se introdujo en una jeringa de 5 mL con aguja, se registró el peso inicial de la jeringa con la muestra y se adicionó en la celda de Karl Fischer, se registró el peso final y la diferencia de pesos se registró en el Software. la muestra se dejó mezclar dentro de la celda por 4 minutos antes de iniciar la titulación. Se registró el contenido de agua obtenido para cada muestra.

#### *5.5.1.2 Análisis de TFA*

En la SPPS, algunas resinas (como la resina Rink Amida) requieren el uso de TFA para el desanclaje del péptido de la resina; por este motivo, los péptidos pueden contener excesos de TFA y en los péptidos catiónicos (con residuos de Arg, Lys, His), se presenta como sal de trifluoroacetato, es de aclarar que el ion trifluoroacetato también se presenta en el amino terminal. Es necesaria la remoción de este contraión trifluoroacetato en los péptidos debido a que, incluso pequeñas cantidades de TFA, pueden afectar significativamente los ensayos biológicos, la conformación del péptido e impedir el análisis por espectroscopía IR ya que el TFA tiene una fuerte banda de absorción en  $1673\text{ cm}^{-1}$  que impide la observación de las bandas de los grupos amino (39).

Es posible calcular el contenido teórico de TFA en el péptido teniendo en cuenta los posibles equivalentes de TFA en la molécula por la cantidad de Lys, Arg o His que tenga el péptido incluyendo el grupo amino terminal. Por ejemplo, el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>: ((RRWQWR)<sub>2</sub>-K-*Ahx*-C)<sub>2</sub> tiene 4 amino terminales y 12 Arg para un total de 16 equivalentes de trifluoroacetato en la molécula (las Lys no cuentan

porque el grupo amino de la cadena lateral está formando un enlace peptídico). Posterior, se calcula el peso molecular de la molécula con el aducto del contraíón:

$$\text{Peso molecular péptido} = 4594 \text{ Da}$$

$$\text{Peso molecular TFA} = 114 \text{ Da}$$

$$\text{Peso molecular aducto} = 4594 \text{ Da} + 114 \text{ Da} \times 16 \text{ eq} = 6418 \text{ Da}$$

Por último, se calcula el % de TFA en la molécula:

$$\% \text{ TFA} = \frac{114 \text{ Da} \times 16 \text{ eq}}{6418 \text{ Da}} \times 100 = 28,4 \% \text{ TFA}$$

Entre los métodos reportados para el análisis del TFA se reporta el análisis por cromatografía iónica (40) y análisis por GC-MS usando derivatización pre columna y Headspace (41,42). Estos métodos requieren el uso de instrumentación e insumos que pueden ser costosos o puedan estar no disponibles; adicionalmente, la derivatización requiere pasos adicionales que hacen el método más complicado, comprometiendo el resultado final por la manipulación de la muestra por aumento de la incertidumbre. Sin embargo, se ha reportado un método para la cuantificación del TFA en péptidos por HPLC usando detector UV empleando una columna C18 con endcapping polar (43). Este último método se implementó y validó en este trabajo para la cuantificación del contraíón en el péptido.

Instrumental/ Materiales y métodos: Se utilizó un equipo HPLC Hitachi Primaide con detector DAD, columna: Phenomenex Synergi Hydro RP (150 × 4,6 i.d., 4,6 μm, 80 Å), longitud de onda: 195 nm, flujo: 1,0 mL/min, inyección 20,0 μL, fase móvil: Buffer H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH = 2,6 acetonitrilo (solvente B), elución: isocrática 5 min para el análisis de las soluciones de TFA y elución por gradiente 0/0/100/100/0/0 %B en 0/5/6/9/10/16 min para el análisis del péptido. Como reactivos se utilizó agua tipo I y TFA grado espectroscopía.

*Procedimiento experimental:* Las soluciones STOCK de TFA se prepararon pesando 1000 mg de agua, posteriormente se pesaron 20,0 mg de TFA y se adicionó la suficiente agua para alcanzar la concentración de 2,00 mg/g. Las muestras de péptidos se prepararon pesando 1,00 mg de péptido y disolviendo a 1000 mg de agua. Las muestras se dispensaron en viales y se inyectaron.

#### **5.5.1.3 Medición del contenido de péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>**

El contenido de un péptido en el producto de síntesis obtenido es estimado respecto al peso del péptido liofilizado, su pureza cromatográfica y la absorción que presente a 205 nm (44). Sin embargo, se puede determinar el contenido del péptido cuantificando respecto a la cantidad de residuos aromáticos (Trp, Tyr, Phe, His) que tenga la molécula y la absorción que presente el péptido a 280 nm (45). En este estudio, se cuantificó el contenido del péptido en el lote aprovechando que LfcinB (20-25)<sub>4</sub> tiene ocho residuos de Trp (W), y usando una curva de calibración del triptófano libre.

*Instrumental/materiales y métodos:* Se utilizó un equipo HPLC Hitachi Primaide con detector DAD, columna: Chromolith HighResolution RP 18e (50 × 4,6 i.d., 150 Å), longitud de onda: 210 nm, flujo: 2,0 mL/min, inyección 10,0 µL, fase móvil: agua-TFA 0,05% (solvente A): acetonitrilo-TFA 0,05% (solvente B), elución: gradiente 5/5/50/100/100/5/5 %B en 0/1/9/9.1/12/12.1/15 min. Como reactivos se utilizó agua tipo I, TFA grado espectroscopía y L-Triptófano.

*Procedimiento experimental:* Las soluciones STOCK del péptido (4,00 mg/g) y L-Triptófano (0,80 mg/g) se prepararon por separado pesando 8,00 mg y 1,90 mg del péptido y el L-Triptófano respectivamente, posteriormente se adicionaron 2000 mg de agua a cada una para alanzar las concentraciones deseadas del STOCK. Las curvas de calibración se prepararon mezclando las alícuotas del péptido y el L-

Triptófano necesarias para cada nivel y se completaron a 1000 mg de solución. Las muestras del péptido medidas en la repetibilidad y precisión intermedia se prepararon pesando 1,00 mg del péptido y se adicionaron 1000 mg de agua. Las muestras se dispensaron en viales y se inyectaron.

### **5.5.2 Selectividad/Especificidad**

En la USP se menciona que la selectividad para ensayos de cuantificación implica proveer un resultado exacto, que permite una declaración completa del contenido o la potencia del analito en la muestra (7). Este parámetro debe ser evaluado antes que cualquier otro con el fin de determinar que la señal obtenida es inequívocamente asignada al analito de interés sin interferencias de alguna otra sustancia presente en la muestra (28).

En la evaluación de la selectividad se busca demostrar que la respuesta del sistema de detección obtenida se debe al analito de interés y no es afectado por interferencias potenciales que puedan estar presentes. Los interferentes son definidos por la IUPAC como un error sistemático causado por la presencia de un contaminante en la muestra (46). Según lo sugerido por la USP, para poder determinar la selectividad se deben realizar mediciones de una muestra que contenga las purezas identificadas, pero que no contenga el analito. Debido que el analito de interés es un péptido sintético, no se cuenta con los interferentes aislados y completamente identificados, por lo tanto, se sugiere para el análisis de la muestra, contrastar con un método alternativo, el cual tiene que ser bajo una técnica analítica diferente y debe encontrarse validado (7). Por lo cual se hizo uso de la técnica HPLC-MS (8,28,47). La selectividad es expresada para una técnica cromatográfica como:

- La resolución entre el pico del analito de interés y su impureza más cercana.
- La pureza del pico determinada con un detector de arreglo de diodos (DAD) en un rango espectral definido; para el caso de las moléculas peptídicas y sus impurezas la zona a trabajar corresponde al espectro UV.

*Procedimiento experimental:* A partir de la metodología validada para la detección vía HPLC-MS, se determinó la identidad de la señal correspondiente al analito de interés y a los interferentes por espectrometría de masas de alta resolución. Complementando el resultado obtenido por LC-MS, se realizó la determinación de la pureza del pico por HPLC-DAD (8,47), esta se determinó tomando el espectro UV de la señal de interés en todo el pico cromatográfico. Posteriormente, los espectros obtenidos son normalizados y comparados, una similitud cercana a 1000 indica alta pureza del pico (8,28,47,48).

Para la metodología por Karl Fischer, se comparó la respuesta obtenida para los blancos de metanol junto con la respuesta obtenida para el péptido disuelto en metanol, se verificó que los dos grupos son diferentes significativamente en su señal a un  $\alpha = 0,05$

*Criterios de aceptación:* Se dice que cumple la selectividad cuando se tenga:

- *Pureza de pico:* No se detecta coelución de picos que sean interferentes con la respuesta del analito (28).
- *Karl Fischer -prueba t:* Diferencia de un  $\alpha = 0,05$  entre el contenido de agua en el blanco y la muestra.

Adicionalmente, la USP exige adjuntar los cromatogramas con los picos debidamente identificados y nombrados (7).

### 5.5.3 Linealidad e Intervalo

#### 5.5.3.1. *Determinación de intervalo lineal, intervalo dinámico y límites de detección y cuantificación*

Para la construcción de la curva de calibración se inició por la determinación del factor de respuesta con una solución del analito entre 0,5 mg/mL a 1,0 mg/mL. Una vez determinado el factor de respuesta se estableció la concentración adecuada para la preparación de la solución STOCK, seguido de la preparación de la curva con puntos equidistantes (niveles con distribución lineal). El intervalo lineal se determinó dentro del 5% de la desviación de la mediana de los factores de respuesta y el intervalo dinámico se fijó hasta el punto de saturación del detector.

El LOD y LOQ se determinó a partir de una curva de calibración a bajas concentraciones y se calculó como:

$$LOD = \frac{3.3S_a}{b} \quad [3]$$

$$LOQ = \frac{10S_a}{b} \quad [4]$$

Donde  $S_a$  es el error en el intercepto y  $b$  es la pendiente.

#### 5.5.3.2 *Definición del intervalo de trabajo*

El 100% de la concentración de la solución de trabajo es definida aproximadamente en el medio del intervalo lineal. Según especificaciones de la USP, para ensayos de contenido de un producto farmacéutico el rango de trabajo debe ser 80-120% de la solución de trabajo (7).

### ***5.5.3.3 Realización de la curva de calibración y evaluación del intervalo***

La curva de calibración se construye mínimo con 5 niveles de concentración equidistantes según especificaciones de la USP (7), los niveles son obtenidos a partir de una solución STOCK y preparados por dilución, cada nivel es inyectado por quintuplicado.

### ***5.5.3.4 Evaluación de la linealidad***

Siguiendo la definición de linealidad por la USP y la ICH (7,30), se debe obtener una relación lineal (o proporcional a un modelo matemático bien definido) entre el resultado obtenido y la concentración del analito. Por “resultado” se entiende como el contenido de activo en el producto farmacéutico, el resultado es obtenido a partir de la curva de calibración y es este el que se tiene en cuenta para los posteriores análisis.

La linealidad se evaluó primero visualmente por la gráfica de señal vs concentración, una vez se determinó que sí existe un comportamiento lineal creciente en la gráfica, se realizó el análisis de regresión lineal ( $y = \beta_0 + \beta_1x$ ) o cuadrática ( $y = \beta_0 + \beta_1x + \beta_2x^2$ ) para obtener el modelo de regresión más adecuado a los datos experimentales; a partir de los resultados obtenidos del análisis de regresión se reportó:

- Predictores  $\beta_0, \beta_1, \beta_2$
- Coeficiente de determinación  $R^2$

Para comprobar la significancia de los parámetros  $\beta_0, \beta_1, \beta_2$  se utilizó el programa R, donde se realizó la prueba t a dos colas y se evaluó la significancia del parámetro a un  $\alpha = 0,05$

Para el coeficiente de determinación  $R^2$  no existe prueba estadística, sino que se compara el valor obtenido con el valor reportado en literatura, que para ingrediente activo debe ser mayor a 0,995 según la FDA (49).

#### ***5.5.3.5 Análisis de residuales***

La gráfica de residuales se construyó con los residuales obtenidos según el modelo de regresión aplicado; si en la gráfica no se presenta ningún tipo de tendencia se confirma que el modelo de regresión es el adecuado, también se analizó que no presentara un comportamiento de cono, ya que esto indicaría que no hay homocedasticidad en los residuales u otro tipo de comportamiento (por ejemplo, de parábola) que pueda dar indicios de que se debe aplicar un modelo de regresión diferente.

#### ***5.5.3.6 Análisis de la varianza (ANOVA)***

La ANOVA es aplicada para analizar las fuentes de variación (regresión y residual) para saber cuál explica mejor la variación en la variable respuesta. Sin embargo, la ANOVA es una prueba paramétrica y tienen que comprobarse los supuestos para que la prueba sea válida. Los supuestos se enlistan en la Tabla 3.

Si los supuestos no se cumplen hay que aplicar pruebas no paramétricas o hacer una transformación de los datos para hacerlos normales. Una vez se comprueben los supuestos, se aplica la ANOVA, para lo cual se calculan los parámetros y el F calculado según la ANOVA. De aquí, nos interesa que la regresión muestre ser significativa (rechaza  $H_0$ ) y la desviación (o "lack of fit") no significativa (rechaza  $H_i$ ).

**Tabla 3.** Supuestos para la ANOVA y la regresión lineal, las pruebas estadísticas son aplicadas con un  $\alpha = 0,05$ .

Supuesto	Prueba	Criterio de aceptación
Normalidad de residuales	Shapiro-Wilk Q-Q plot	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rechazar <math>H_1</math> para quedarse con <math>H_0</math> que representa normalidad de datos.</li> <li>Los cuantiles en Q-Q plot tienen que estar sobre la línea.</li> </ul>
Homogeneidad de varianzas en residuales (homocedasticidad)	Gráfica de residuales Bartlett Levene	<ul style="list-style-type: none"> <li>Residuales no pueden mostrar forma de cono.</li> <li>Rechazar <math>H_1</math> para quedarse con <math>H_0</math> que representa homocedasticidad.</li> </ul>
Independencia del error	Gráfica de residuales	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los residuales no pueden mostrar tendencias.</li> </ul>

## 5.5.4 Veracidad

### 5.5.4.1 Valor verdadero

La veracidad implica la comparación contra un valor verdadero o de referencia (33), para este caso se tomará el valor de referencia de un MRC para la técnica de Karl Fischer y el porcentaje de recuperación para la cuantificación del contraión. Según lo establecido en la USP, se requieren mínimo 9 determinaciones en el intervalo de trabajo establecido (7). Cada réplica se preparó desde la pesada.

### 5.5.4.2 Evaluación de veracidad

La veracidad es evaluada en los niveles de concentración bajo, medio y alto de la solución de trabajo. La veracidad se expresa en términos de sesgo (32).

El error absoluto es calculado como:

$$E = \bar{X} - \hat{X} \quad [5]$$

Dónde  $\bar{X}$  es el promedio y  $\hat{X}$  es el valor considerado como verdadero.

El error relativo es calculado como:

$$\%E = \frac{\bar{X} - \hat{X}}{\hat{X}} \times 100 \quad [6]$$

## 5.5.5 Precisión

### 5.5.5.1 Procedimiento experimental

Según lo establecido en la USP, se requieren mínimo 9 determinaciones en el intervalo de trabajo establecido y 6 determinaciones en el 100% de la concentración de trabajo (7). Al igual que para la veracidad, cada réplica se preparó desde la pesada. La precisión como repetibilidad se evaluó el mismo día por el mismo analista; mientras que, la precisión intermedia, se determinó cambiando el día.

La repetibilidad del sistema (repetibilidad instrumental) se determinó por repetidas inyecciones de una misma muestra mientras que la repetibilidad del método se determinó por réplicas preparadas desde la pesada de la muestra (28).

### 5.5.5.2 Evaluación de precisión

#### *Evaluación de la repetibilidad*

Se reportó el resultado obtenido de la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) junto con los intervalos de confianza calculados para cada nivel de concentración como:

$$\bar{X} \pm t \times \frac{S}{\sqrt{n}} \quad [7]$$

Donde  $\bar{X}$  es el promedio, t es el valor t de tablas a un  $\alpha = 0,05$  con n-1 grados de libertad, S es la desviación estándar y n es el número de datos.

La repetibilidad del sistema (repetibilidad instrumental) obtenida debe ser inferior a la repetibilidad del método, la expresión que permite relacionar ambos CV es:

$$CV_{Método} = CV_{Sistema} \times \sqrt{2} \quad [8]$$

#### *Evaluación de la precisión intermedia*

La precisión intermedia se evaluó a partir del análisis de homocedasticidad, se aplicó la prueba de Bartlett a ambos grupos, si las varianzas son homogéneas entre los días de análisis para un nivel de masa o concentración se valida la precisión intermedia. Debido a que las medias fueron próximas entre los días de análisis no se realizó prueba t ni ANOVA.

#### **5.5.6 Robustez**

La robustez fue planeada para evaluarse al final de la validación, ya que está relacionada con estudios inter-laboratorio y, en consecuencia, con la evaluación de la reproducibilidad; sin embargo, cabe el riesgo de obtenerse un método no robusto al final de la validación, lo que lleva al redesarrollo y optimización de la metodología (50), por lo tanto, es altamente recomendable hacer un estudio de robustez en el desarrollo de la metodología analítica (según lo sugiere la ICH) (30) o al inicio de la validación (50). La robustez evalúa los efectos generados por potenciales fuentes de variación sobre una o más respuestas del método, principalmente los factores evaluados son cuantitativos. Las fuentes de variación detectadas deben ser controladas o se debe especificar en el procedimiento las precauciones pertinentes (50).

### ***5.5.6.1 Selección de los factores y los niveles***

Las fuentes de variación o “factores” son seleccionados según la necesidad analítica. Los factores usados para cromatografía líquida son reportados en (50), de los cuales para el método a validar aplican los siguientes:

- Flujo de la fase móvil.
- Factores de la fase móvil:
  - a. Concentración de TFA en la fase móvil.
  - b. Concentración de buffer en la fase móvil.
- Longitud de onda

Los niveles sobre cada factor seleccionado son definidos por criterio del experimentador y son simétricos sobre el valor nominal definido en el procedimiento experimental (50).

### ***5.5.6.2 Selección de los diseños experimentales***

Para un método cromatográfico se puede seleccionar como respuesta la altura o el área del pico para la evaluación de la robustez. Los factores son introducidos en un diseño experimental como el arreglo factorial  $2^n$  y arreglo factorial  $3^3$  para superficies de respuesta.

### ***5.5.6.3 Metodología de superficies de respuesta***

La metodología de superficies de respuesta es la aplicación de técnicas estadísticas y matemáticas para el desarrollo, mejora y optimización de procesos. También se ha aplicado en la formulación de nuevos productos así como en la mejora de productos existentes (51). Para aplicar esta metodología, es necesario que el modelo

aplicado sea al menos cuadrático con mínimo tres niveles por factor para obtener la superficie de respuesta. El modelo cuadrático es de la forma:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Donde son los predictores del modelo,  $x_i$  son las variables de entrada y  $\varepsilon$  es el error del modelo. Los diseños experimentales comúnmente aplicados para obtener las superficies de respuesta son el diseño central compuesto (52), el diseño Box Behnken (53) y el arreglo factorial  $3^n$  (54,55). Los resultados experimentales se procesaron usando R para obtener los valores de  $\beta$ , la significancia de cada factor con sus interacciones y la gráfica de superficie de respuesta.

#### ***5.5.6.4 Procedimiento experimental***

A partir de la muestra seleccionada como 100% de la concentración de solución de trabajo se realizaron los experimentos correspondientes al arreglo factorial aplicado (8 para un arreglo factorial  $2^3$  y 27 para un arreglo factorial  $3^3$ ) variando las condiciones experimentales según corresponda. Al final se realizaron experimentos correspondientes a las condiciones experimentales nominales. Los análisis se realizaron de forma aleatoria.

#### **5.5.7 Test de Idoneidad del Sistema (System Suitability Test)**

Los análisis de Idoneidad del Sistema (en inglés: System Suitability Test - SST) son realizados para verificar que el sistema cromatográfico es adecuado para su análisis intencionado. El test está basado en el concepto de que el equipo, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que puede ser

evaluado de este modo. El análisis de las muestras no es aceptable hasta que los requerimientos del System Suitability se hayan cumplido (7,56).

Si el SST falla se debe parar el equipo, revisar el problema y realizar de nuevo el ensayo de SST; los problemas están asociados con baja repetibilidad en el automuestreador, envejecimiento de la columna, errores en la bomba y errores en la preparación de la fase móvil.

La USP sugiere una serie de parámetros para la evaluación de la SST, pero sólo se consideran aquellos que garanticen que el método y el sistema están funcionando como se espera (56), entre estos parámetros se seleccionaron:

- Tiempo de retención: fijando un rango de tiempos de retención dónde eluye el analito.
- Precisión: RSD inferior al 2% para 5 inyecciones.

Los resultados de System Suitability se presentan en el ANEXO C

## 6. Resultados y discusión

El objetivo de esta investigación fue la caracterización fisicoquímica de un lote del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> obtenido por SPPS, incluyendo la validación de tres metodologías analíticas que permitieran cuantificar en el lote: agua, TFA residual y péptido. Para alcanzar estos objetivos, esta investigación se dividió en las etapas experimentales descritas a continuación:

*Etapas 1: Desarrollo y optimización del método para el análisis de péptidos sintéticos por RP-HPLC.* En esta etapa se evaluó la eficiencia de cuatro columnas y se seleccionaron como analitos el ácido benzoico y el péptido sintético de seis residuos, LfcinB (20-25). Luego se desarrolló y optimizó el método de análisis para una mezcla de siete péptidos sintéticos por RP-HPLC empleando elución por gradiente y se evaluó su desempeño en las cuatro columnas. El desarrollo y optimización del método se basó en la ecuación del factor de retención del gradiente  $k^*$  (Ecuación 2). En esta etapa se utilizó el equipo Agilent Infinity 1260 con detector UV.

*Etapas 2: Síntesis de un lote de 100 mg del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>.* Se escaló el proceso sintético y se obtuvo el péptido tetramérico por SPPS utilizando la estrategia Fmoc/tBu descrita anteriormente.

*Etapa 3. Caracterización del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> empleando RMN y MS.* Se utilizaron las técnicas: RMN (1D-2D), y espectrometría de masas (MALDI-TOF), LC-MS (ESI-Q, ESI-QTOF). Se utilizó el dímero precursor como control para establecer capacidad del método para discernir entre el dímero y el tetrámero.

*Etapa 4. Validación de la metodología para determinar el contenido de agua por Karl Fischer.* Se realizó utilizando la técnica de Karl Fischer coulombimétrico.

*Etapa 5. Validación de la metodología para la determinación del contenido de TFA residual por HPLC.* Se utilizó el equipo HPLC con detector DAD y la columna C18 con endcapping polar, Synergi Hidro-RP.

*Etapa 6. Validación de la metodología para la determinación del contenido del péptido por RP-HPLC.* Se empleó el equipo HPLC con detector DAD y la columna monolítica Chromolith HighResolution de fase reversa (C18)

Los resultados obtenidos en cada una de las etapas formuladas se describen a continuación.

## **6.1 Etapa 1. Desarrollo y optimización del método para el análisis de péptidos sintéticos por RP-HPLC**

Las características de las columnas seleccionadas para el desarrollo de esta etapa se describen en la Tabla 4, Se empleó una columna empacada (Kromasil EternityXT), una monolítica (Chromolith HighResolution) y dos Core-Shell (Kromasil EternityShell y Sunshell). La eficiencia de las cuatro columnas se determinó usando como analitos (i) el ácido benzoico (PM = 122,1g/mol) y (ii) una molécula de tipo

peptídico, específicamente el péptido sintético LfcinB (20-25): RRWQWR-NH<sub>2</sub> (PM = 986,1 g/mol). Se empleó elución isocrática con acetonitrilo al 15%, TFA 0,05% en agua como fase móvil, se realizaron corridas cromatográficas a diferentes flujos para obtener la altura mínima de plato teórico y flujo óptimo por medio del modelo de van Deemter. Adicionalmente se caracterizaron las columnas empleando gráficas cinéticas (Kinetic Plots).

Tabla 4 Características de las columnas C-18 empleadas

Nombre	Fase Estacionaria	L mm	Diámetro (d)			V <sub>m</sub>
			Columna mm	Partícula μm	Poro Å	
<b>Kromasil EternityXT 5-C18</b>	Totalmente porosa	50	4,6	5,0	100	0,45
<b>Chromolith HighResolution RP-18e</b>	Monolítica	50	4,6	-	150	0,72
<b>Kromasil EternityShell 2.5-C18</b>	Core-Shell	50	2,1	2,5	100	0,12
<b>SunShell C18</b>	Core-Shell	50	2,1	2,6	90	0,13

\*Volumen muerto medido con NaNO<sub>3</sub>

### 6.1.1 Van Deemter

La ecuación de van Deemter (ecuación [9]) (57–59), determina cómo influye la velocidad de flujo lineal ( $u$ ) sobre la altura de plato teórico ( $H$ ) y explica el ensanchamiento de banda, y consecuente aumento de  $H$ , por la efecto de tres fenómenos: la difusión de Eddy ( $A$ ), la difusión longitudinal ( $B$ ) y la resistencia a la transferencia de masas ( $C$ ).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad [9]$$

Con el fin de comparar las cuatro columnas, se construyeron las gráficas de van Deemter para el ácido benzoico y el péptido LfcinB (20-25) (Figuras 5A y 5B).

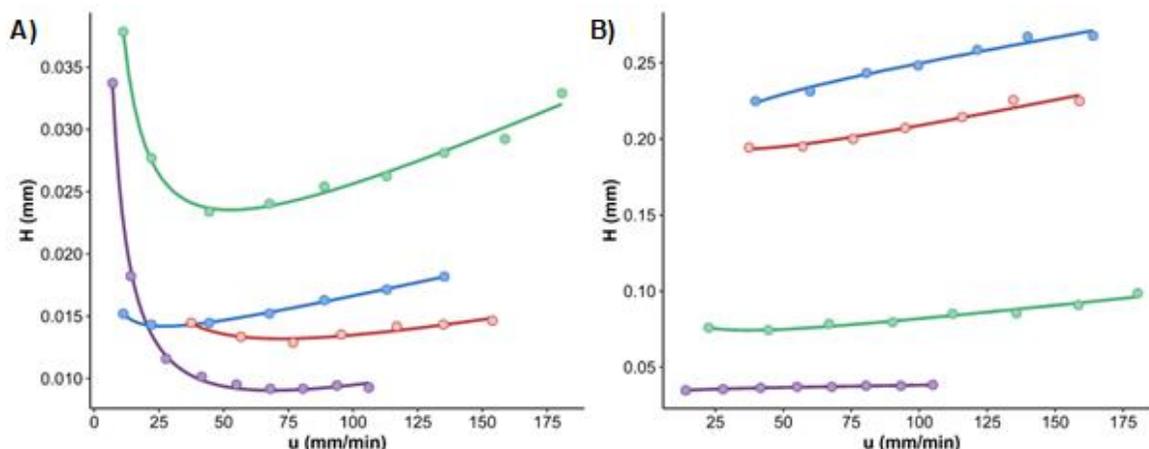
Adicionalmente, se calcularon los términos A, B y C mediante la herramienta Solver de Excel y se determinó el flujo óptimo y la  $H_{\min}$  para cada columna Tabla 5.

Tabla 5 Resumen de los parámetros de van Deemter (A, B y C),  $u_{\text{opt}}$  y  $H_{\min}$  para las columnas evaluadas.

Analito	Columna	A $\mu\text{m}$	B $\mu\text{m}^2/\text{ms}$	C ms	$u_{\text{opt}}$ mm/min	$H_{\min}$ $\mu\text{m}$
Ácido benzoico (PM = 122,1 g/mol)	Kromasil EterntiyXT 5-C18	14,37	4,184	5,271	53,46	23,76
	Chromolith Highresolution RP-18e	3,156	3,574	2,535	71,24	9,176
	Kromasil EternityShell 2.5-C18	11,95	0,5126	2,642	26,42	14,28
	SunShell C18	7,344	3,509	2,415	72,32	13,16
Péptido RRWQWR (PM = 986,1 g/mol)	Kromasil EterntiyXT 5-C18	60,90	4,144	10,72	37,31	74,23
	Chromolith HighResolution RP-18e	33,88	0,05426	2,845	8,285	34,67
	Kromasil EternityShell 2.5-C18	200,6	3,910	27,68	22,55	221,4
	SunShell C18	172,8	5,911	19,31	33,20	194,2

Las gráficas de van Deemter para el ácido benzoico (Figura 5A), utilizando las columnas Core-Shell mostraron mayor eficiencia que la columna empacada, ya que los valores de H fueron menores (Tabla 5). Esto es resultado del diseño de la partícula en las columnas Core-Shell, que mejora desempeño en estas columnas (60–62), adicionalmente estas columnas contienen partículas de diámetro menor (dp: 2,6 y 2,5  $\mu\text{m}$ ), factor que también incrementa su eficiencia. Entre las columnas dos columnas Core-Shell evaluadas, la SunShell presentó un mejor desempeño que la Kromasil EternityShell, con una disminución del término A y  $H_{\min}$ ; La reducción del término A en la SunShell puede estar relacionado con un mejor empaquetamiento de las partículas en la columna.

Para el ácido benzoico, el término B fue significativamente menor para la Kromasil EternityShell comparado con las otras columnas (siete a ocho veces más bajo, Tabla 5), lo que indica que la difusión longitudinal es un factor menos preponderante en el ensanchamiento del pico y es posible trabajar a flujos bajos con poca pérdida de eficiencia. Sin embargo, en la práctica es más conveniente trabajar a flujos altos para lograr separaciones en menor tiempo, a pesar de que se presente una pérdida de eficiencia la cual no es significativa. A flujos altos, el término C va a influir entonces en mayor proporción en la altura del plato H. Para el ácido benzoico, la columna empacada presentó el mayor valor de C (5,271 ms), mientras que las columnas monolítica y Core-Shell presentaron valores del término C similares (valor cercano a 2,5 ms); en consecuencia, estas columnas presentarán una pérdida de eficiencia similar, la cual es causada por la resistencia en la transferencia de masa.



**Figura 5** Gráficas de van Deemter obtenidas para la columna empacada Kromasil EternityXT (verde), columna monolítica Chromolith HighResolution (morado), columnas Core-Shell Kromasil EternityShell (azul) y SunShell (rojo) para el análisis de A) ácido benzoico y B) péptido LfcinB (20-25) Fase Móvil: agua-TFA 0,05%: acetonitrilo-TFA 0,05% 85:15 v/v, temperatura ambiente,  $\lambda = 210$  nm, inyección 5,0  $\mu$ L. Ambos analitos preparados a 1 mg/mL.

Las columnas Core-Shell evaluadas demostraron ser eficientes para el análisis de una molécula de bajo peso molecular como el ácido benzoico. Sin embargo, en el análisis del péptido LfcinB (20-25) (Figura 5B), el  $H_{\min}$  obtenido con las columnas

Core-Shell fue cercano a 200  $\mu\text{m}$  lo que indica que su desempeño disminuyó, incluso siendo menor que el encontrado para la columna empacada Kromasil EternityXT, que tuvo un  $H_{\text{min}}$  cercano a 75  $\mu\text{m}$ .

En general, para todos los casos, el término A es significativamente mayor para el péptido LfcinB (20-25) comparado con el ácido benzoico; lo cual concuerda con el hecho de que el mayor tamaño del péptido hace que su desplazamiento durante el proceso cromatográfico sea más tortuoso. Este efecto es más notorio para las columnas Core-Shell, donde el valor del término A fue hasta seis veces mayor al observado en la columna Chromolith HighResolution. Por otra parte, el término B no es observable en las curvas de la Figura 5B, debido al bajo valor del coeficiente de difusión del péptido. Sin embargo, fue posible calcular el valor del término B con los datos experimentales, donde la separación en la columna monolítica tuvo el menor valor de B comparado con las otras columnas utilizadas.

Por otro lado, el valor del término C fue de ocho y diez veces mayor en las Core-Shell para el análisis del péptido LfcinB (20-25) comparada con la columna monolítica y el doble respecto a la columna empacada (para el ácido benzoico). Este incremento posiblemente se debe al menor tamaño de poro de estas columnas, con 90 y 100  $\text{Å}$ , haciendo que la interacción del analito con la fase estacionaria sea más difícil, causando un incremento en coeficiente de resistencia a la transferencia de masa. Al contrario, la columna monolítica fue más efectiva comparado con las otras columnas, posiblemente debido a que los diámetros de poro son de 150  $\text{Å}$ , lo que facilita la interacción del péptido con la fase estacionaria. Esto se vio reflejado en los valores del término C obtenidos para la columna monolítica, donde fueron similares tanto para el ácido benzoico como para el péptido, a pesar de que este último es una molécula de mayor tamaño.

La columna monolítica presentó el mejor desempeño tanto para la molécula de bajo peso molecular, el ácido benzoico, como para la molécula peptídica de masa cercana a 1000 Da, el péptido LfcinB (20-25), mostrando que es una columna es muy versátil para el análisis cromatográfico en elución isocrática.

### 6.1.2 Gráficas cinéticas

Las gráficas cinéticas muestran el comportamiento del número de platos teóricos (N) en función del tiempo de retención ( $t_R$ ). Este tipo de gráficas fueron publicadas por primera vez por Desmet *et. al.* (63,64) y han sido ampliamente utilizadas desde entonces para la caracterización de columnas tanto en elución isocrática como gradiente (65–67). En estas gráficas, el número de platos teóricos N (Eficiencia) y el tiempo muerto  $t_0$  son calculados con la ecuación [10] y [11], donde  $\Delta P$  puede ser la presión operacional real en cada experimento o la máxima presión permitida por el equipo ( $\Delta P_{\max} = 400$  bar para el Agilent Infinity 1260)  $\eta$  es la viscosidad de la fase móvil,  $u$  y  $H$  son la velocidad de flujo lineal y la altura del plato teórico respectivamente (obtenidas de los datos de van Deemter), y  $K_v$  es la permeabilidad obtenida de la ecuación [12], donde  $L$  es la longitud de la columna y el valor de  $K_v$  es obtenido de la pendiente de la curva  $\Delta P/L$  versus  $u$  (60). El tiempo muerto  $t_0$  puede ser expresado en términos de tiempo de retención por la ecuación del factor de retención [13].

$$N = \left(\frac{\Delta P}{\eta}\right) \left[\frac{K_v}{uH}\right] \quad [10] \quad t_0 = \left(\frac{\Delta P}{\eta}\right) \left[\frac{K_v}{u^2}\right] \quad [11]$$

$$K_v = \frac{uL\eta}{\Delta P} \quad [12] \quad t_R = t_0(1 + k) \quad [13]$$

En las gráficas cinéticas para el ácido benzoico (Figura 6A), se puede observar que las columnas Core-Shell presentaron un desempeño cinético similar a tiempos de retención bajos. Estas columnas son la mejor opción para realizar análisis de

analitos que no requieran altas eficiencias y permite la utilización de columnas cortas. Por otro lado, las Core-Shell no alcanzaron altas eficiencias incluso a tiempos de retención altos, donde la columna monolítica si presentó eficiencias mayores. De hecho, la columna monolítica presentó mayores valores de  $N$ , aproximadamente tres veces más que los observados en las otras columnas evaluadas (flecha horizontal) y se pueden lograr análisis hasta seis veces más rápidos para el mismo valor de  $N$  (flecha vertical).

Cabe destacar que las gráficas cinéticas son una extrapolación de la eficiencia más alta posible que pueda alcanzarse para un tiempo de análisis dado, si se trabajara a la presión máxima alcanzada por el equipo a una longitud de columna optimizada. Esta longitud de columna puede ser una columna larga o un conjunto de columnas imaginarias acopladas de diferente longitud que trabajan a la misma presión (66). Al observar los tiempos de análisis más largos en la Figura 6A, se podrían alcanzar valores de  $N$  de hasta 127000 para un tiempo extremadamente largo de hasta 8250 minutos. Según la gráfica, la columna empacada podría alcanzar eficiencias más altas que la columna monolítica, pero esto implica una longitud de columna imaginaria muy alta; si  $L = NH$ , donde  $H$  es la altura del plato teórico, para el punto de más alta eficiencia el valor de  $N$  es de 211070, con un valor de  $H$  de 0,038 mm (obtenido de van Deemter para este punto), la longitud de la columna sería de 8021 mm.

la gráfica cinética para el péptido LfcinB (20-25) se presenta en la Figura 6B. Las columnas Core-Shell presentan valores de  $N$  siete veces menores que las otras columnas (línea horizontal), mostrando que estas columnas no son la mejor opción para el análisis de moléculas de alto peso molecular en elución isocrática. Las columnas Core-Shell pueden lograr análisis rápidos con tiempos de 3.0 minutos, pero los valores de  $N$  estarían alrededor de 300-350. Estas eficiencias no serían

suficientes para la separación de mezclas complejas, pero pueden ser apropiadas para el análisis de un solo analito. Por otro lado, las columnas empacada y monolítica presentan eficiencias más altas que las Core-Shell con valores de  $N$  de 4000 a 53000. La monolítica presenta tiempos de análisis menores comparada con la columna empacada; el tiempo de análisis es reducido en la mitad (flecha vertical). A pesar de que la columna empacada puede alcanzar las eficiencias más altas, el  $t_R$  sería de 2600 minutos que implicaría el uso de una columna muy larga, como se explicó anteriormente.

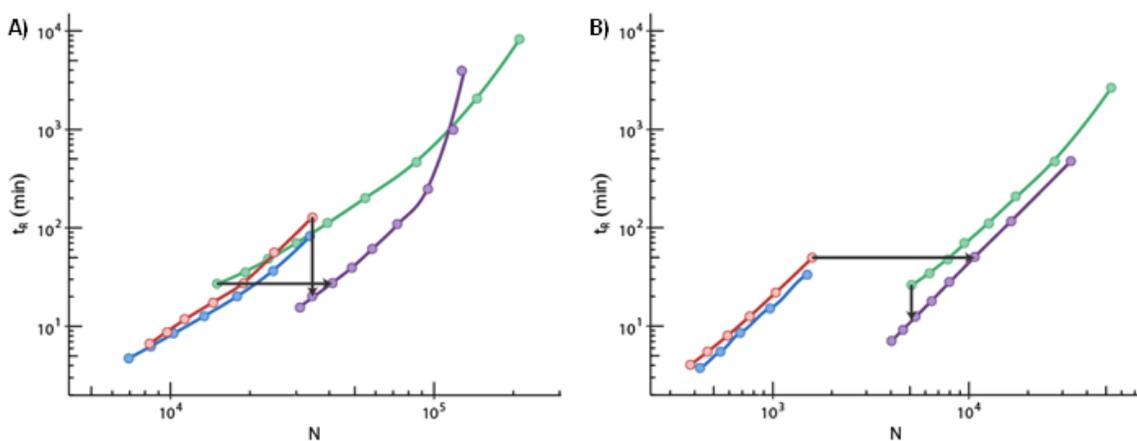


Figura 6 Gráficas cinéticas para la columna empacada Kromasil EternityXT (verde), columna monolítica Chromolith HighResolution (morado), columnas Core-Shell Kromasil EternityShell (azul) y SunShell (rojo) para el análisis de A) ácido benzoico and B) péptido LfcinB (20-25). Fase Móvil: agua-TFA 0,05%: acetonitrilo-TFA 0,05% 85:15, temperatura ambiente,  $\lambda = 210$  nm, inyección  $5,0 \mu\text{L}$ .

## 6.1.3 Desarrollo y optimización del método de análisis

### 6.1.3.1 Desarrollo del método

Para desarrollar el método de separación se preparó una mezcla de siete péptidos sintéticos (Tabla 6) cuyas purzas variaban entre el 80-95%. Esta mezcla fue analizada usando elución con gradiente que consiste en modificar la composición de la fase móvil durante el análisis cromatográfico. En este tipo de análisis el factor

de retención se expresa como  $k^*$ , ecuación [2]. La separación de analitos utilizando la elución por gradiente depende de varios factores como son el tiempo de gradiente ( $t_G$ ), el flujo ( $F$ ), el volumen muerto ( $V_m$ ), el rango del gradiente ( $\Delta\phi$ ) y la constante  $S$  que depende del peso molecular de los analitos (Tabla 6), (68,69), y puede ser calculado con la ecuación [14], donde  $M$  es el peso molecular del analito (69). La resolución para este sistema fue calculada con la ecuación [15], donde  $t_{R1}$  y  $t_{R2}$  son los tiempos de retención del par crítico y  $W_1$  y  $W_2$  son los anchos de los picos medidos a la mitad de la altura.

$$S \approx 0.25M^{0.5} \quad [14]$$

$$R_s = 1.18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} \quad [15]$$

Tabla 6 Lista de péptidos sintéticos analizados y organizados por orden de elución con los  $S$  y  $k^*$  calculados. Ahx: ácido 6-aminohexanoico, Fluores: fluoroescina.

Péptido código	Secuencia <sup>a</sup>	PM (g/mol)	pI <sup>b</sup>	S	$k^* = \frac{0,87t_G F}{V_m \Delta\Phi S}$	
					Método 1	Métodos 2-4
1	SPINNTKPHEAR-Ahx-C	1578,8	8,49	9,93	4,3	12,9
2	RRWQWR	986,13	12,30	7,85	5,4	16,3
3	FKCRRWQWRMKKLGA	1993,5	11,74	11,2	3,8	11,5
4	(RRWQWR) <sub>2</sub> -K-Ahx-C	2298,3	12,30	12,0	3,6	10,7
5	RWQWRWQWR	1486,7	12,30	9,64	4,4	13,3
6	(Fluores)-Ahx-RRWQWR	1457,6	12,30	9,54	4,5	13,4
7	AAVALLPAVLLALLAP	1514,9	5,57	9,73	4,4	13,2

<sup>a</sup>Todos los péptidos tienen terminación amida en el extremo C-terminal. <sup>b</sup>Datos calculados con [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/). El software no tiene modificaciones en los péptidos, entonces estas no fueron consideradas

En la Figura 7 se presenta el perfil cromatográfico de la separación de la mezcla de péptidos usando la columna empacada (Panel A) y la columna monolítica (Panel B). Para ambas separaciones se utilizó el gradiente del método 1: 5/5/70/100/100/5/5 %B en 0/1/12,5/12,6/15,6/15,7/19 min, con un flujo de 2 mL/min; el  $t_G$  correspondió a 11,5 minutos y el producto  $t_G F$  fue 23,0 mL. Se puede observar que en las dos columnas el método 1 permitió separar los siete péptidos de la mezcla, que se muestran numerados en orden de elución en la figura 7 y en la Tabla 6. Se puede

observar que en ambos casos el par crítico corresponde a los péptidos 3 y 4, FKCRRWQWRMKKLGGA y (RRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx-C respectivamente, y cabe resaltar que el péptido 4 corresponde al dímero precursor del tetrámero objeto de este estudio. La resolución obtenida para el par crítico ( $R_s$ ) fue 1,3 en la columna empacada y 2,0 en la monolítica. Es interesante observar que el método en la columna monolítica comparado con el método en la columna empacada permite obtener mejores separaciones a pesar de tener valores de  $k^*$  menores, específicamente entre 3,6 y 5,4 (método 1, Tabla 6); mientras que en la columna empacada presentó valores de  $k^*$  entre 5,7 y 8,7. Adicionalmente, en el perfil cromatográfico de la columna monolítica se observan especies que no son observadas en el perfil cromatográfico obtenido con la empacada. Cabe anotar que para la columna empacada fue necesario inyectar el doble de volumen (10  $\mu$ L) que el utilizado para la columna monolítica (5,0  $\mu$ L); este volumen adicional puede también contribuir al ensanchamiento de banda y a la asimetría de los picos (70).

Los resultados obtenidos nos indican que el método 1 utilizando la columna monolítica permitió separar con buena resolución los péptidos sintéticos con secuencias similares, específicamente los péptidos 2 al 6 son derivados de LfcinB. Es de resaltar que en este método la presión generada por la columna monolítica fue de 43,0 bar, lo cual nos permite usar equipos HPLC normales, que tienen  $P_{\max}$  de 400 bar.

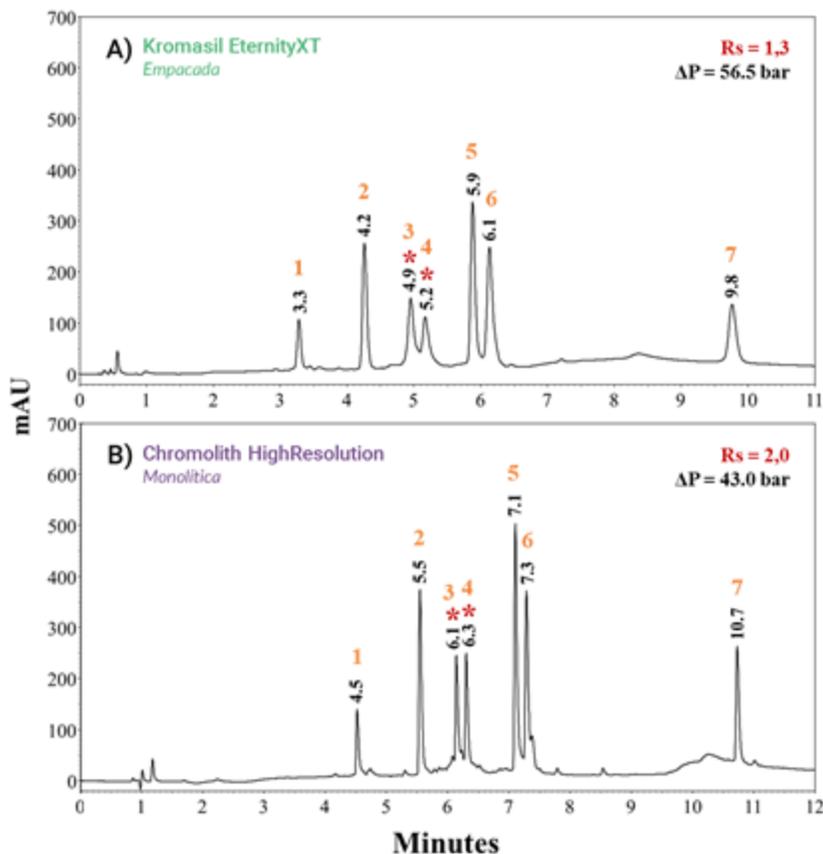


Figura 7 Perfiles cromatográficos de la mezcla de péptidos para las columnas A) Kromasil EternityXT (método 1, 10,0  $\mu$ L); B).Chromolith HighResolution (método 1, 5,0  $\mu$ L).  $\lambda = 210$  nm.  $t_{\text{delay}} = 1,0$  min. Los asteriscos indican el par crítico seleccionado para comparar las separaciones. Estos picos corresponden específicamente a los péptidos FKRRWQWRMKKLLGA y (RRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx-C

Dado que en esta investigación era necesario caracterizar los péptidos por HPLC acoplado a espectrometría de masas, el siguiente paso fue transferir el método 1 a las columnas Core-Shell, que presentan altas eficiencias a flujos bajos, adecuados para los análisis por LCMS usando como interfaz ESI. Para esta transferencia del método se decidió reducir el producto  $t_G F$  en la ecuación [2] a la mitad (de 23,0 a 11,5), a pesar de esta reducción, se incrementaron los valores de  $k^*$ ; pasando de valores entre 3 y 6 para la columna monolítica y empacada, a valores de 10 a 17 para las columnas CoreShell (Tabla 6). En esta transferencia del método, se inició con un flujo de 0,3 mL/min y para obtener el producto  $t_G F$  de 11,5 fue necesario aplicar un

$t_G$  de 38,3 minutos; de este procedimiento se obtuvo el método 2 (Tabla 7). Los perfiles cromatográficos obtenidos con las columnas Core-Shell mostraron mejores separaciones comparadas a las obtenidas en las columnas empacada y monolítica; las resoluciones fueron mayores y se observaron nuevas especies en el cromatograma, indicando que el método 2 en estas columnas tiene mayor poder de resolución (Figura 8). La aparición de nuevas especies observadas en los cromatogramas de la mezcla utilizando las columnas monolítica y Core-Shell posiblemente sean subproductos de la síntesis de los péptidos (71).

La mejora del resultado en las columnas Core-Shell está relacionada con el incremento en el valor de  $k^*$  causado por un valor menor de  $V_m$  en estas columnas. Es importante anotar que para obtener el mismo valor de  $k^*$  para los dos métodos, el factor  $t_G F / V_m$  debe ser el mismo (68,72). Los valores de  $S$  y  $k^*$  calculados para los métodos 1-4 son resumidos en la Tabla 6, se observa que los valores de  $k^*$  en los métodos 2-4 para las columnas Core-Shell fueron tres veces más grandes que los valores para el método 1 (utilizando las columnas monolítica y empacada).

Tabla 7 Métodos aplicados y optimizados para el análisis de la mezcla de péptidos. El Método 1 fue aplicado en las columnas Kromasil EternityXT y Chromolith HighResolution; métodos 2, 3 y 4 fueron aplicados en columnas Kromasil EternityShell y SunShell.

<b>Método</b>	<b>F</b>		<b><math>t_G</math></b>	
<b>N°</b>	<b>mL/min</b>	<b><math>\Delta\phi</math></b>	<b>min</b>	<b><math>t_G F</math></b>
<b>1</b>	2,00	0,65	11,5	23,0
<b>2</b>	0,30	0,65	38,3	11,5
<b>3</b>	0,40	0,65	28,7	11,5
<b>4</b>	0,50	0,65	23,0	11,5

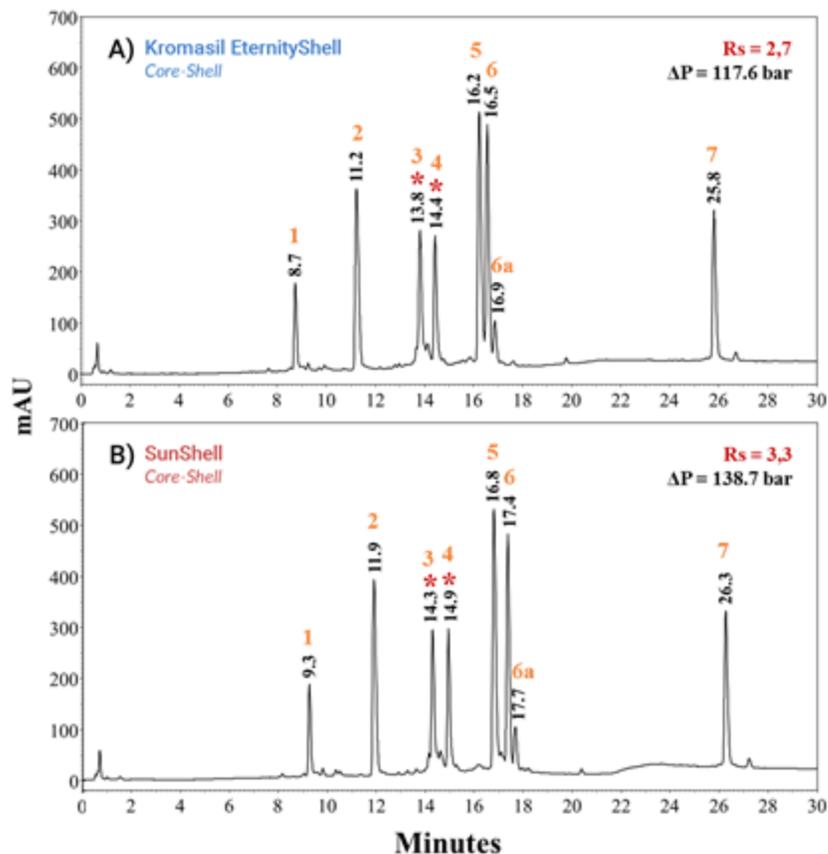


Figura 8 Perfiles cromatográficos de la mezcla de péptidos para las columnas: A) Kromasil EternityShell (método 2, 5,0  $\mu\text{L}$ ); B) SunShell (método 2, 5,0  $\mu\text{L}$ ).  $\lambda = 210 \text{ nm}$ .  $t_{\text{delay}} = 1,0 \text{ min}$ . Los asteriscos indican el par crítico seleccionado para comparar las separaciones; específicamente los péptidos FKRRWQWRMKKLG A y (RRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx-C

Comparando los perfiles cromatográficos de la columna monolítica (Figura 7, B) respecto al resultado obtenido con las columnas Core-Shell (Figura 8) se puede concluir que la transferencia del método fue efectiva, debido a que el espacio ocupado por los analitos en los cromatogramas es similar en ambos casos. La resolución obtenida para el par crítico de comparación (picos 3 y 4) en las Core-Shell ( $R_s$  2,7 y 3,6) fue mayor respecto a la monolítica ( $R_s$  2,0), lo que indica que las columnas Core-Shell fueron más eficientes que la monolítica para separar la mezcla de péptidos; adicionalmente, el perfil cromatográfico de la mezcla utilizando las columnas Core-Shell mostraron más especies que no eran claramente visibles en el perfil cromatográfico obtenido con la columna monolítica, ejemplo de esto es el pico

6a que en el perfil cromatográfico obtenido con las columnas monolíticas aparece como un hombro, mientras que en la separación con las columnas Core-Shell se puede distinguir que esta especie corresponde a una impureza del pico 6. Aunque la columna SunShell mostró una resolución más alta que la Kromasil EternityShell, ambas resoluciones fueron mayores a 2,0, lo que indica que los picos se encuentran separados observándose línea base entre ellos lo que sugiere que la separación obtenida con el método utilizando ambas columnas permite resolver la mezcla y analizar el péptido tetramérico LfcinB (20-25)<sub>4</sub>.

#### **6.1.3.2 Optimización del método**

El método 2 en las Core-Shell fue optimizado basado en la ecuación del  $k^*$  [2] para obtener los métodos 3 y 4 (Tabla 7). Esta optimización se llevó a cabo incrementando el flujo  $F$  y manteniendo el producto  $t_R F$  constante, para lo que se redujo  $t_R$ . La optimización permitió reducir los tiempos de análisis manteniendo la resolución del método 2. Específicamente en los métodos 3 y 4 los tiempos de análisis, comparados con el método 2, fueron reducidos en 6 y 10 minutos, respectivamente. Además, las resoluciones no fueron afectadas significativamente por la optimización, Figura 9.

En conclusión, se transfirió el método para el análisis de los péptidos en columnas Core-Shell con incremento en la resolución y tiempos de análisis optimizados a 20 minutos; la importancia del desarrollo de estos métodos es que estos pueden ser aplicados en el análisis de péptidos utilizando equipos UHPLC que son los empleados para LC-MS.

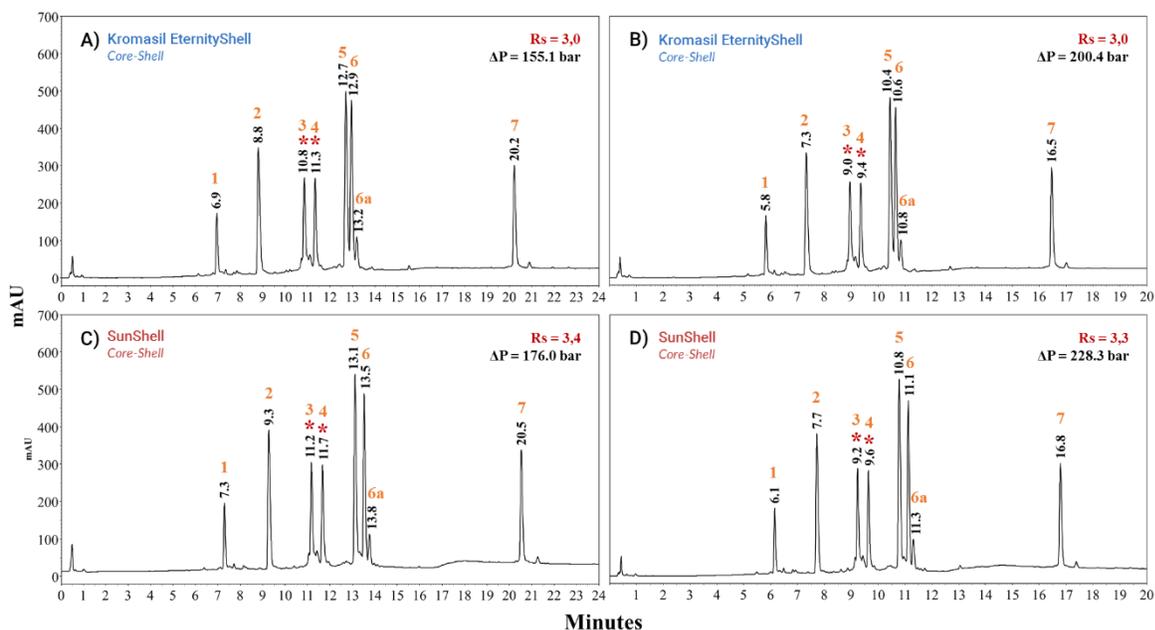


Figura 9 Perfiles cromatográficos de la optimización basada en la ecuación del  $k^*$  para las columnas Kromasil EternityShell (A: método 3, B: método 4) y SunShell (C: método 3, D: método 4). Inyección = 5,0  $\mu$ L.  $\lambda$  = 210 nm.  $t_{\text{delay}}$  = 1,0 min. Los asteriscos indican el par crítico seleccionado para comparar las separaciones; específicamente los péptidos FKCRRWQWRMCKKLG y (RRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx-C

Se puede concluir en esta etapa de la investigación que la columna monolítica fue la más versátil para el análisis de ambos analitos empleados (ácido benzoico y péptido LfcinB (20-25)) según las gráficas de van Deemer y Kinetic Plots. Para el análisis de la mezcla de péptidos sintéticos, la columna monolítica también tuvo un desempeño destacable, donde esta columna tuvo mayor eficiencia que la columna empacada y tuvo eficiencias equiparables con columnas que son típicamente aplicadas para UHPLC, como son las columnas Core-Shell. Aunque el método fue más eficiente en las columnas Core-Shell que en la columna monolítica, estas columnas no son adecuadas para el uso en HPLC convencional al mostrar altas presiones incluso a flujos de 0,5 mL/min; por esto, se seleccionó la columna

monolítica para la validación del método de la cuantificación del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>.

## **6.2 Etapa 2. Síntesis del lote de 100 mg del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>**

Para la síntesis del lote péptido tetramérico se requirió optimizar las condiciones de síntesis debido a que se utilizaron 500 mg de resina Rinkamida (0,46 meq/g). Para obtener este péptido primero se sintetiza el péptido precursor (RRWQWR)<sub>2</sub>K-Ahx-C, que luego por la reacción de oxidación se forma el puente disulfuro obteniéndose la forma tetramérica. Los resultados de la síntesis del dímero precursor mostraron que para la incorporación de los aminoácidos Fmoc-Lys(Fmoc)-OH y la Fmoc-Gln(Trt)-OH (Q) requirieron dos ciclos de reacción para su acople completo, los demás aminoácidos no presentaron dificultad ya que requirieron un solo ciclo de reacción. El péptido precursor obtenido fue purificado mediante cromatografía RP-SPE 200 mg del péptido precursor puro fueron oxidados y la reacción fue monitoreada por RP-HPLC, después de 24 horas se observó que la reacción finalizó, luego la mezcla de reacción fue desalinizada por RP-SPE y liofilizada obteniéndose 124 mg de producto con una pureza superior al 95%. Los perfiles cromatográficos del dímero precursor, la reacción de oxidación (Panel A) y del tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub> final (Panel B) se presentan en la Figura 10.

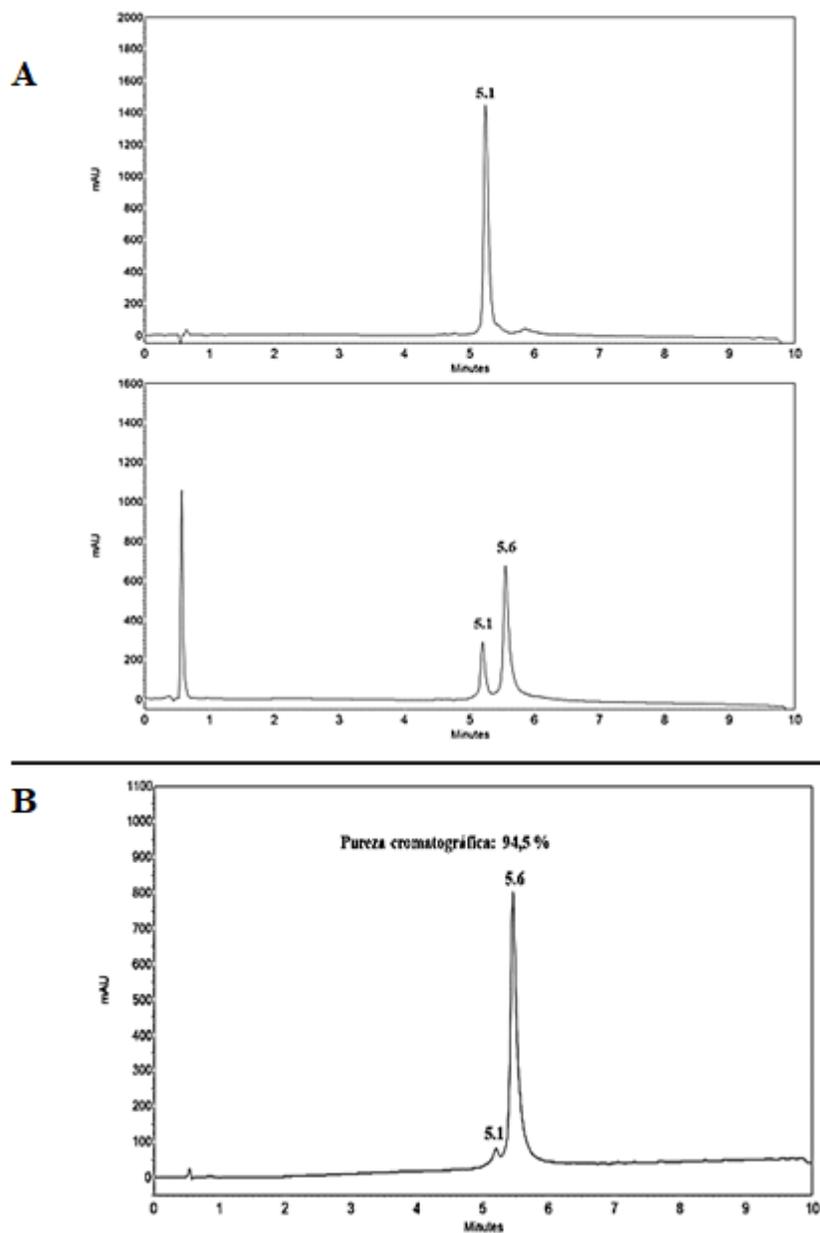


Figura 10 A) Perfil cromatográfico del dímero precursor puro y monitoreo de la reacción de oxidación C) perfil cromatográfico del péptido tetramérico puro. Columna: Chromolith Performance RP-18e (100 × 4,6 mm), Inyección = 5,0  $\mu$ L.  $\lambda$  = 210 nm.

## 6.3 Etapa 3. Caracterización del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> empleando RMN y MS

Se realizó la caracterización del dímero precursor (RRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx-C y del lote del tetramero LfcinB (20-25)<sub>4</sub> obtenidos. Se emplearon las técnicas de <sup>1</sup>H RMN, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY y espectrometría de masas, específicamente, análisis por MALDI-TOF, ESI-cuadrupolo (baja resolución), y ESI-QTOF, de alta resolución, acoplado a cromatografía líquida. Con estos análisis, adicional a la caracterización, se pretendía evaluar si era posible diferenciar el dímero precursor del tetramero LfcinB (20-25)<sub>4</sub>. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

### 6.3.1 Análisis por RMN

Los resultados de la caracterización por <sup>1</sup>H RMN y <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY del dímero precursor (RRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx-C y del tetramero LfcinB (20-25)<sub>4</sub> se muestran en las Figuras 11 y 12. Los espectros obtenidos presentan señales muy similares para los dos péptidos analizados, esto posiblemente debido a que poseen la misma secuencia (RRWQWR)<sub>2</sub>K-Ahx-C. Sin embargo, se observaron algunas diferencias, específicamente, para el dímero se identificó la señal con multiplicidad triplete a un desplazamiento químico de 2,23 ppm que corresponde al protón del grupo tiol S-H de la Cys y la señal multiplete de 2,62 a 2,82 ppm que corresponde a los protones β de la Cys, estas señales no se observaron en el tetramero. (Figura 11A).

Para confirmar la asignación correcta de los protones por <sup>1</sup>H-RMN para la Cys del dímero precursor, se obtuvo el espectro COSY, donde la señal obtenida en la zona 3 (Figura 12A) corresponde a los protones de la posición beta (βH) de la Cys, que están acoplado con los protones de la posición alfa (αH: 2,75; 4,30 ppm); asimismo,

estos protones  $\beta$  están acoplado con el protón del grupo tiol, S-H (2,75; 2,23). Estas señales descritas para el dímero precursor no se observaron en el espectro COSY del tetramero, sugiriendo que la oxidación del dímero precursor fue completa (Figura 12B). Se evidenció que para ambos péptidos las señales dentro de la zona de la huella dactilar en los espectros COSY (zona 5) corresponden a los grupos  $\alpha$ -NH de los aminoácidos de la secuencia peptídica. Los desplazamientos químicos de estas señales se resumen en la Tabla 8.

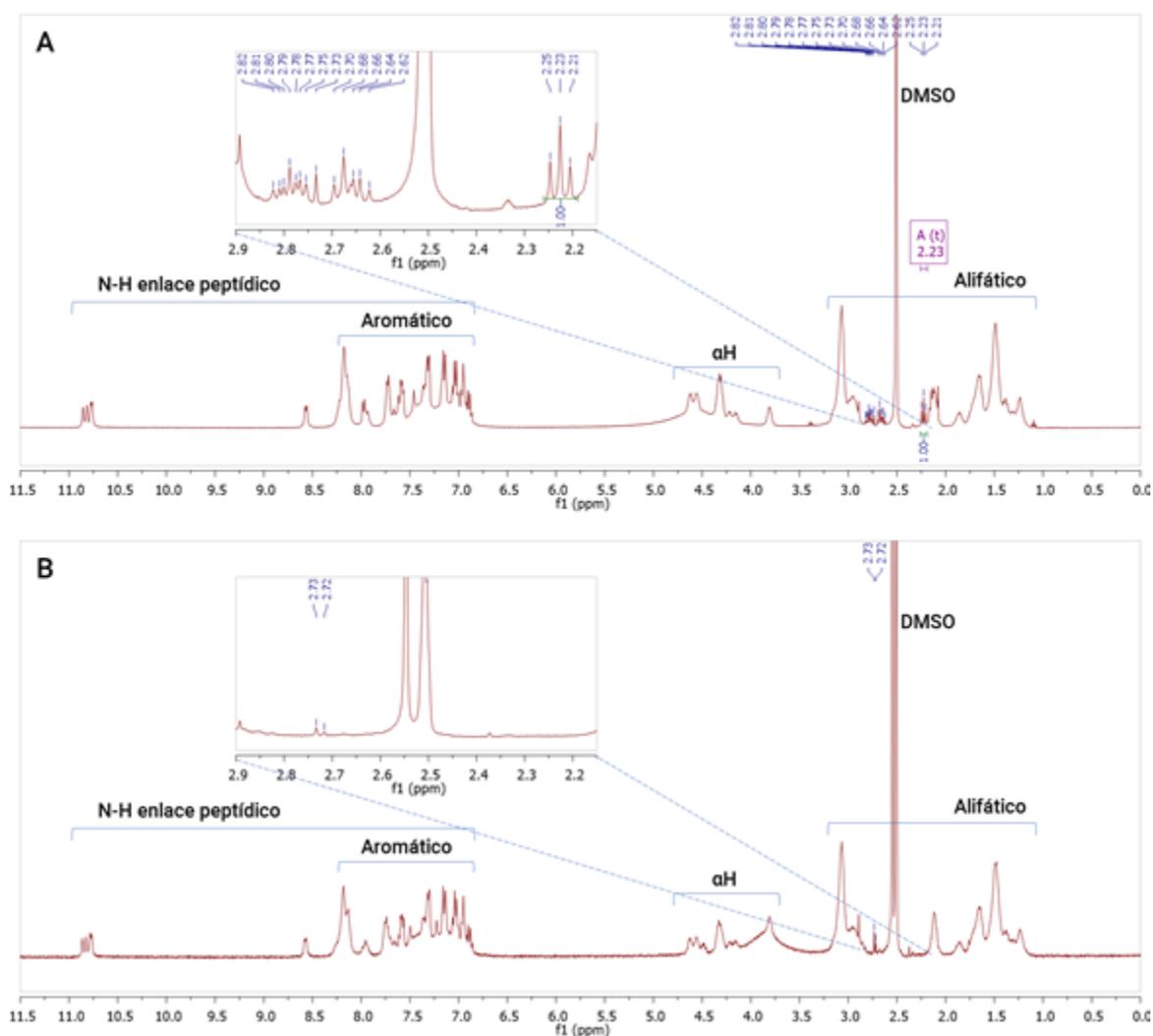


Figura 11 Espectro  $^1\text{H}$  RMN de: (A) dímero precursor, (B) tetramero LfcinB (20-25) $_4$ . Solvente DMSO- $d_6$ .

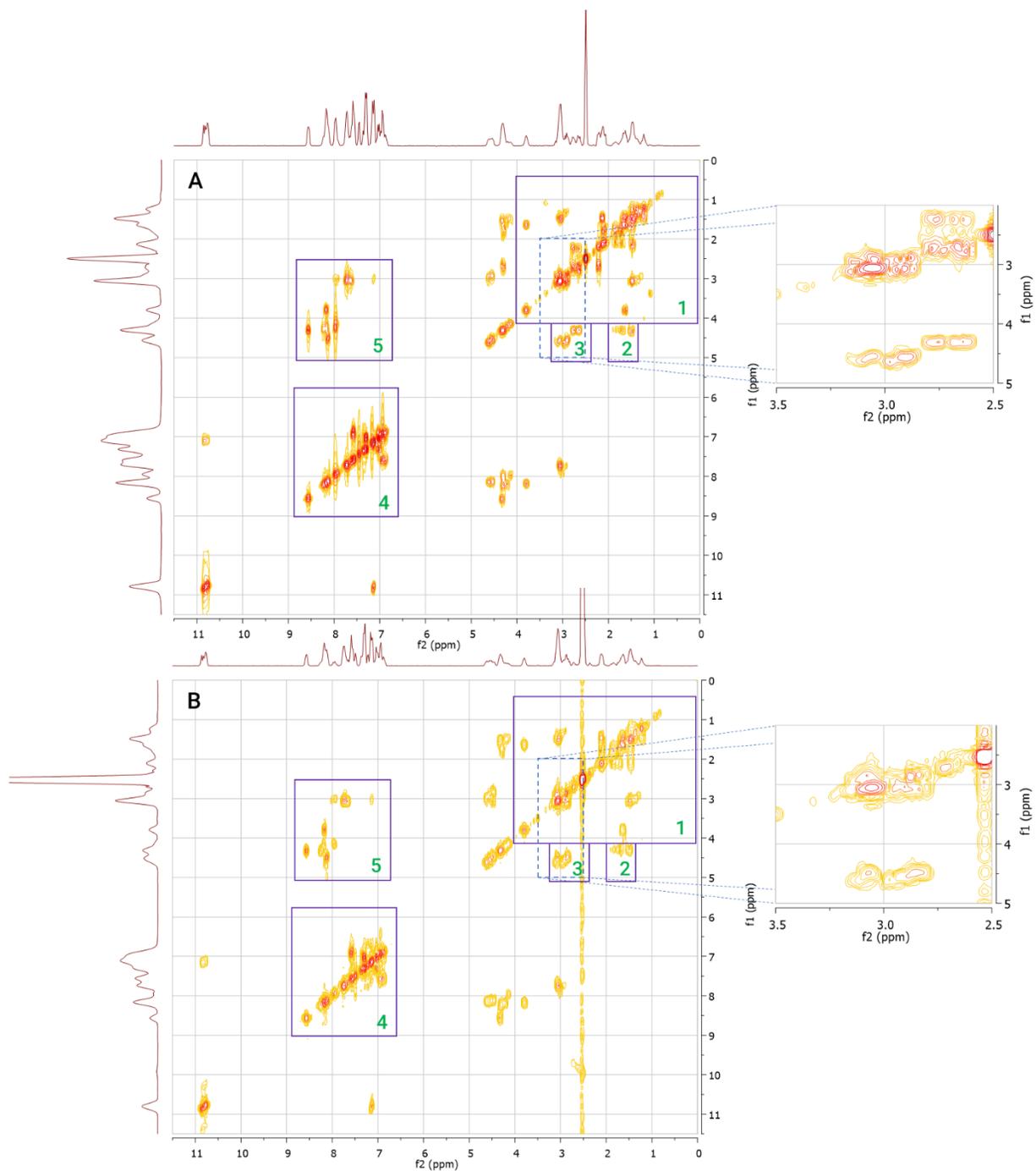


Figura 12 Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de: (A) dímero precursor y (B) tetramero LfcinB (20-25) $_4$ . 1. Protones alifáticos; 2.  $\alpha\text{H}$  y  $\beta\text{H}$  de Arg, Lys, Gln; 3.  $\alpha\text{H}$  y  $\beta\text{H}$  de Cys, Trp; 4. H anillo aromático, H cadena lateral Gln; 5. Zona huella dactilar. Solvente DMSO- $d_6$ .

Tabla 8 Desplazamientos químicos de los protones para los péptidos dimérico y tetramérico. Las señales de Cys corresponden sólo al dímero precursor.

Aminoácido	Tipo de H	$\delta_H$ (ppm)
Arg	$\alpha$ NH	8,23
	$\epsilon$ NH	7,14
Trp	$N_{(1)}$ H	10,85
	$\alpha$ NH	8,13
Gln	$\alpha$ NH	8,56
	$\delta$ NH <sub>2</sub>	7,58
Lys	$\alpha$ NH	8,16
	$\epsilon$ NH	7,64
Cys	$\alpha$ H	4,30
	$\beta$ H	2,75
	S-H	2,23

## 6.3.2 Análisis por espectrometría de masas

### 6.3.2.1 Análisis por ESI-cuadrupolo

El dímero precursor y LfcinB (20-25)<sub>4</sub> se analizaron por LC-MS utilizando un sistema ESI con analizador de cuadrupolo sencillo, los resultados se presentan en la Figura 13. En estos espectros se observaron señales en relaciones m/z correspondientes a especies, del dímero o LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, con cargas múltiples. Por ser un análisis a baja resolución se calculó la carga de cada especie (z) comparando las señales m/z adyacentes con la fórmula:

$$z_1 = \frac{m_2 - 1}{m_1 - m_2}; M = (m_1 \times z_1) - (mH \times z_1) \quad [16]$$

Donde para una pareja de picos adyacentes,  $m_1$  es el pico de mayor relación m/z y  $m_2$  el pico de menor m/z. Este mismo cálculo se realizó para cada par de picos y a

partir de la carga y la relación  $m/z$  se calculó la masa monoisotópica (M) y la masa promedio para cada péptido. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

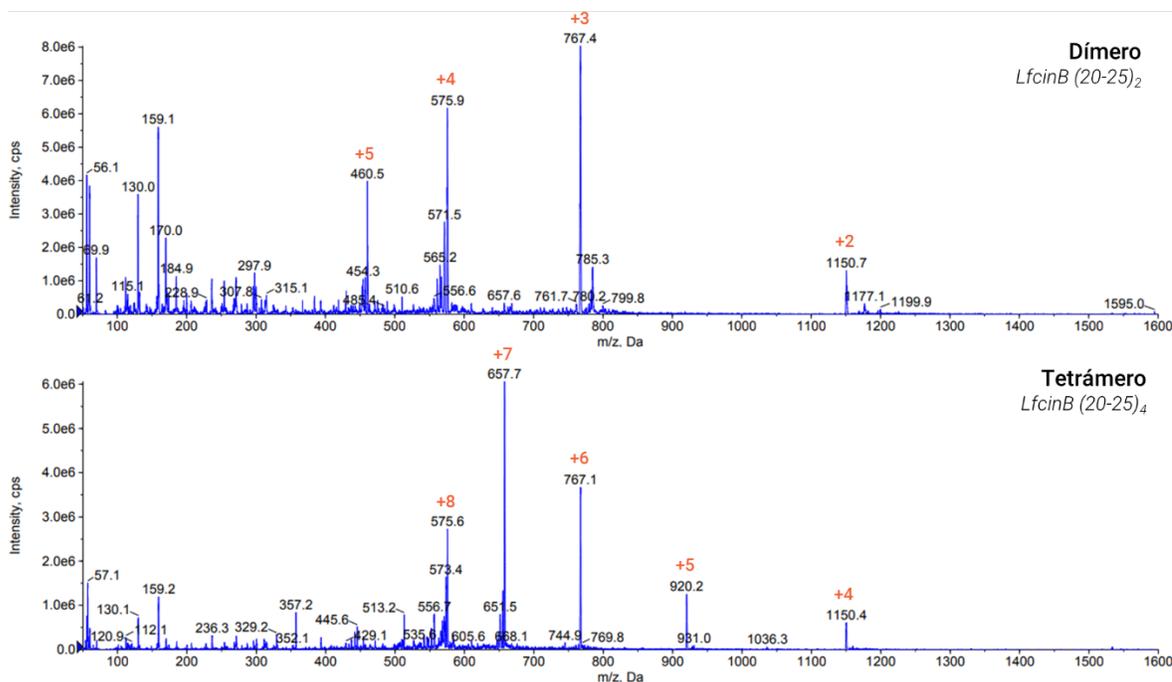


Figura 13 Espectros ESI-cuadrupolo del dímero precursor y tetrámero *LfcinB (20-25)<sub>4</sub>*. Los números en naranja indican la carga de la especie.

Comparando los espectros del dímero precursor y el tetrámero *LfcinB (20-25)<sub>4</sub>*, se observó que tienen tres picos con la misma relación  $m/z$  (con un desfase de 0,3 unidades de  $m/z$ ), además, se debe tener en cuenta que estos picos tienen el doble de carga en el espectro del tetrámero respecto al espectro del dímero. En los espectros obtenidos se observa que en el dímero el pico base tiene carga +3 mientras que en el tetrámero el pico base es el de carga +7. El espectro del dímero mostró cuatro señales mayoritarias correspondientes al péptido con múltiples cargas ( $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M+3H]^{3+}$ ,  $[M+4H]^{4+}$ ,  $[M+5H]^{5+}$ ) y el tetrámero mostró cinco señales ( $[M+4H]^{4+}$ ,  $[M+5H]^{5+}$ ,  $[M+6H]^{6+}$ ,  $[M+7H]^{7+}$ ,  $[M+8H]^{8+}$ ) en el intervalo de  $m/z$  de 0-1600. Estas características descritas permiten diferenciar rápidamente entre el dímero y el tetrámero sin necesidad de calcular la masa del péptido.

Se puede concluir entonces que esta técnica permitió la caracterización de los péptidos por su masa y también se pudo diferenciar el péptido tetramérico LfcinB (20-25)<sub>4</sub> del dímero precursor.

Tabla 9 Resultados masa experimental para el dímero y tetramero por ESI-Cuadrupolo.

<b>Dímero precursor</b>		<b>Masa exacta: 2298,3 Da</b>	
<b>m/z</b>	<b>z</b>	<b>M (Da)</b>	
1150,7	+2	2299,4	
767,4	+3	2299,2	
575,9	+4	2299,6	
460,5	+5	2297,5	
Promedio		2298,9	
Error de masa (ppm)		261	
<b>Tetramero – LfcinB (20-25)<sub>4</sub></b>		<b>Masa exacta: 4594,5 Da</b>	
<b>m/z</b>	<b>z</b>	<b>m (Da)</b>	
1150,4	+4	4597,6	
920,2	+5	4596,0	
767,1	+6	4596,6	
657,7	+7	4596,9	
575,6	+8	4596,8	
Promedio		4596,8	
Error de masa (ppm)		501	

### 6.3.2.2 Análisis por ESI-QTOF

El análisis ESI-QTOF de alta resolución, mostró para el dímero precursor cuatro señales, la ampliación de cada señal mostró la distribución isotópica con la se pudo calcular el valor de la carga (z) asociada a cada señal, y se estableció que las relaciones m/z encontradas corresponden a las especies  $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M+3H]^{3+}$ ,  $[M+4H]^{4+}$  y  $[M+5H]^{5+}$ ; en este espectro el pico base fue el de la especie  $[M+4H]^{4+}$ , Figura 14 (superior). En el análisis de esta molécula por ESI de baja resolución, también se observaron las mismas señales.

Para el caso del tetramero LfcinB (20-25)<sub>4</sub> el espectro presentó ocho señales correspondientes a las especies  $[M+5H]^{5+}$ ,  $[M+6H]^{6+}$ ,  $[M+7H]^{7+}$ ,  $[M+8H]^{8+}$ ,  $[M+9H]^{9+}$ ,  $[M+10H]^{10+}$ ,  $[M+11H]^{11+}$  y  $[M+12H]^{12+}$ . En el espectro el pico base fue la señal de la

especie  $[M+8H]^{8+}$ , Figura 14 (inferior). Los análisis por ESI, de baja y alta resolución, permitieron la caracterización y diferenciación clara del dímero precursor y el tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub>. El análisis por alta resolución permite obtener: (i) la distribución isotópica en las señales, con lo que se calculó la carga asociada a la señal (z), (ii) la medida de la masa monoisotópica con menor error y con mayor número de decimales, Tabla 10.

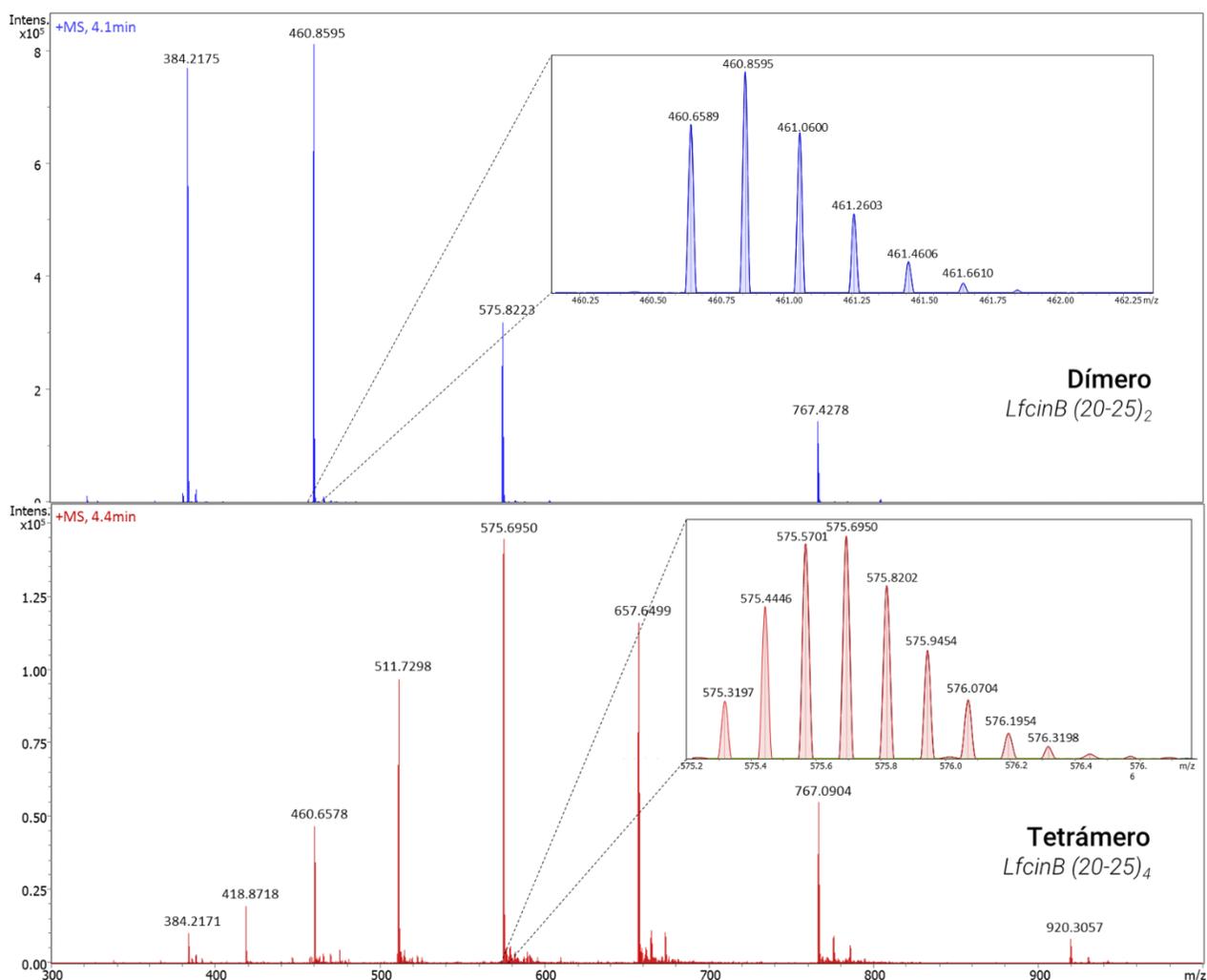


Figura 14 Espectros ESI-QTOF del péptido dímero y tetrámero. La ampliación muestra la distribución isotópica del pico base.

Tabla 10 Resumen de resultados masas ESI-QTOF para el dímero precursor y el tetrámero.

<b>Dímero precursor</b>		<b>Masa exacta: 2298,2558 Da</b>	
<b>m/z</b>	<b>z</b>	<b>M (Da)</b>	
767,0938	+3	2298,2580	
575,5715	+4	2298,2548	
460,6589	+5	2298,2555	
384,0504	+6	2298,2556	
Promedio		2298,2560	
Error de masa (ppm)		0,087	
<b>Tetrámero – LfcinB (20-25)<sub>4</sub></b>		<b>Masa exacta: 4594,4960 Da</b>	
<b>m/z</b>	<b>z</b>	<b>M (Da)</b>	
919,9037	+5	4594,4795	
766,7561	+6	4594,4898	
657,3644	+7	4594,4962	
575,3197	+8	4594,4952	
511,5068	+9	4594,4910	
460,4574	+10	4594,4960	
418,6900	+11	4594,5042	
Promedio		4594,4931	
Error de masa (ppm)		0,62	

### 6.3.2.3 Análisis por MALDI-TOF

Los espectros de masas obtenidos por MALDI tienen la ventaja de ser más simples comparados con los obtenidos por ESI, lo que facilita su interpretación, ya que por lo general se observa directamente la señal correspondiente a la especie  $[M+H]^+$ ; además MALDI es una técnica más sencilla, operativamente hablando. Sin embargo, en los resultados obtenidos para el dímero precursor y el tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub> el pico base es idéntico, con tan sólo 0,186 unidades de m/z de diferencia; este resultado puede prestarse para confusiones debido a que podría interpretarse que se tiene mezcla del dímero precursor y el tetrámero en la muestra. La aparición de la señal en m/z 2296,101 en el espectro del tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub> puede corresponder a la especie  $[M+2H]^{2+}$  o también cabe la posibilidad de que se trate de una especie generada en el proceso de ionización, por rompimiento del enlace disulfuro y consecuente formación del dímero precursor. Realizar la diferenciación

de la masa a partir del valor medio del tetrámero respecto al dímero no fue posible con las condiciones utilizadas, debido a que el equipo empleado (BRUKER Microflex) no poseía la resolución necesaria para ello, esto debido a que no tenía reflectrón, además este equipo se utiliza rutinariamente para el análisis de proteínas por lo que este análisis se realizó para constatar la presencia de las especies de interés de manera preliminar. El pico de 4596,442 observado en el espectro del tetrámero, correspondiente al ion  $[M+H]^+$ , fue clave para la diferenciación respecto al dímero, ya que esta señal no se observó en el espectro de esta molécula.

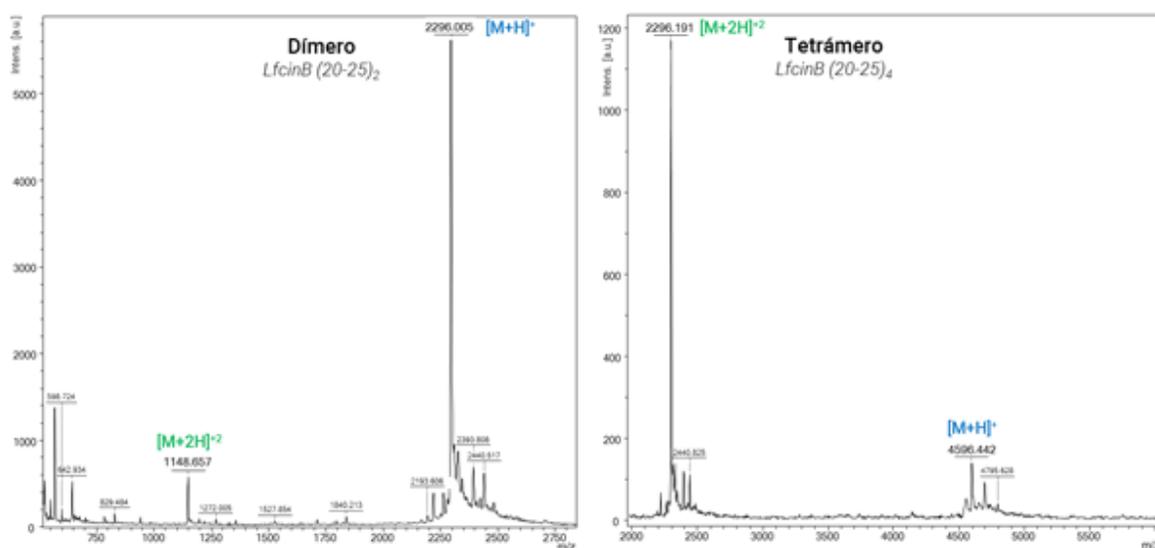


Figura 15 Espectros MALDI-TOF del péptido dímero y tetrámero.

Tabla 11 Resumen resultados masas MALDI-TOF para el dímero y el tetrámero.

<b>Dímero - LfcinB (20-25)<sub>2</sub></b>		<b>Masa exacta: 2298,256 Da</b>		
m/z	Ion	M (Da)	Error masa (ppm)	
2296,005	$[M+H]^+$	2294,997	1418	
1148,657	$[M+2H]^{2+}$	2295,298	1287	
<b>Tetrámero - LfcinB (20-25)<sub>4</sub></b>		<b>Masa exacta: 4594,496 Da</b>		
m/z	Ion	M (Da)	Error masa (ppm)	
4596,442	$[M+H]^+$	4595,434	204	
2296,191	$[M+2H]^{2+}$	4590,366	899	

### 6.3.2.4 Seguimiento reacción descarboxilación del Trp por UHPLC-ESI-QTOF

El uso de espectrometría de masas de alta resolución permitió evidenciar la presencia de un subproducto generado por la desprotección incompleta del anillo indol de la cadena lateral de los residuos de triptófano presentes en el dímero precursor. Tras el proceso de clivaje del dímero precursor, se evidenció que algunos residuos de Trp en la molécula no presentaban la remoción completa del grupo Boc sobre el Nitrógeno del anillo indol (73), la señal correspondiente a esta especie desprotegida parcialmente se presenta como un  $[M+44]^+$ . La reacción de desprotección del anillo indol durante el clivaje se presenta en la Figura 16.

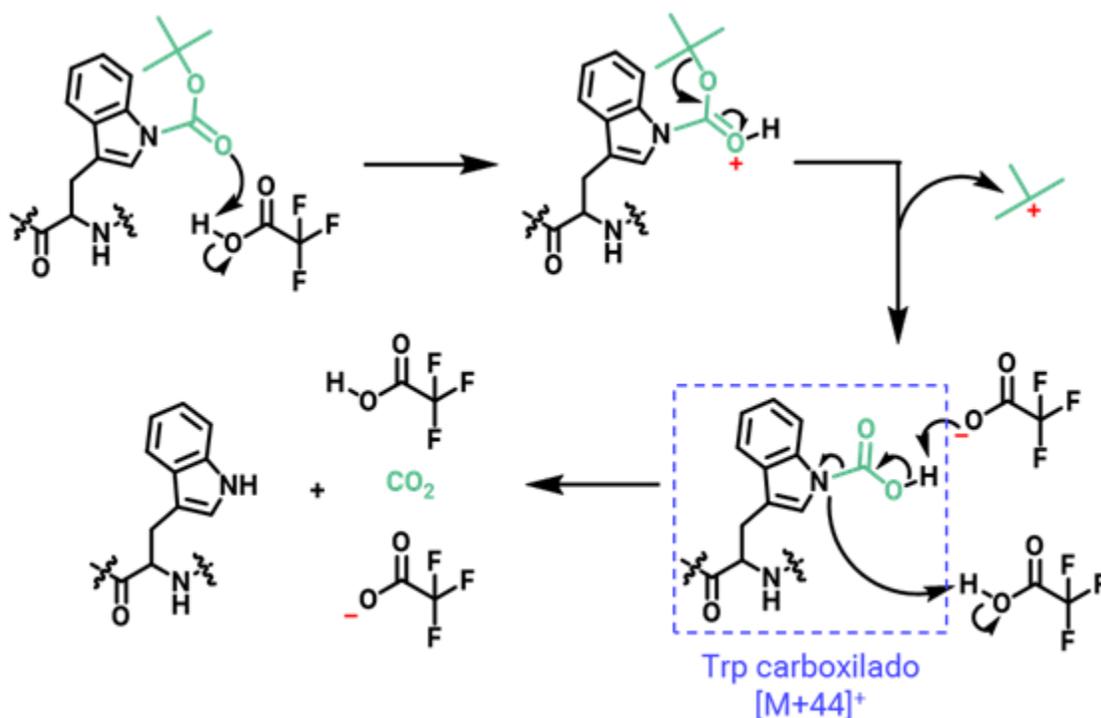


Figura 16 Reacción de desprotección del grupo Boc en el triptófano.

En la Figura 17 se presenta el TIC del dímero precursor crudo (Panel A), en el que se identificó un pico mayoritario a  $t_R = 4,3$  min que correspondería al dímero esperado, sin embargo, se identificó que en este pico coelúan dos especies cuya relación  $m/z$  que corresponden al dímero esperado y al dímero con residuos de Trp con el anillo indol carboxilado (Panel B). El dímero precursor fue puesto 12 horas

en solución acuosa con TFA al 0,05% y almacenado durante 12 horas a 4°C, luego la mezcla fue analizada y se evidenció que la especie descarboxilada ( $t_R = 4,3$  min) aumentó mientras que la carboxilada en el grupo indol disminuyó.

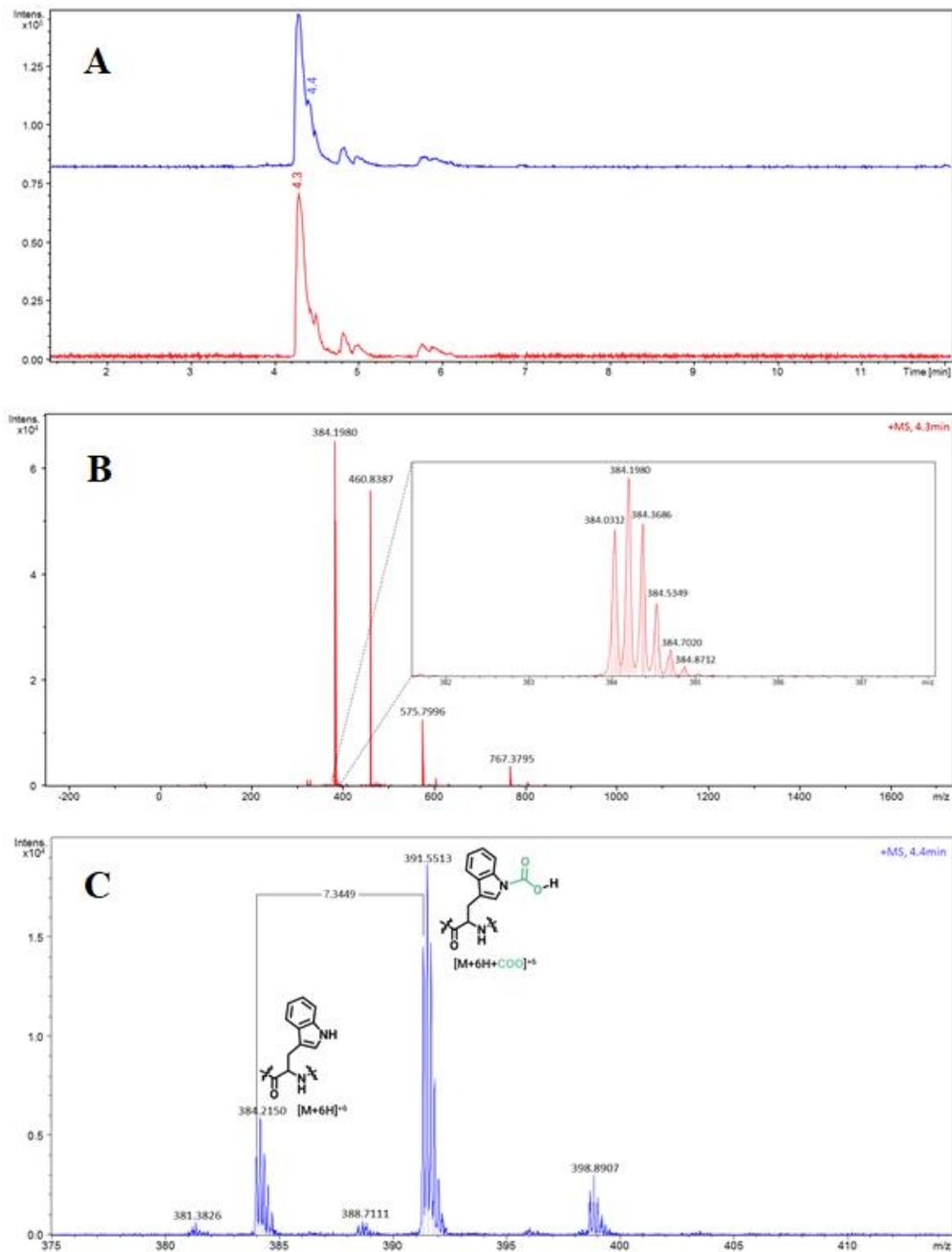


Figura 17 Análisis del dímmero precursor crudo por UHPLC-ESI-QTOF. (A) Perfil cromatográfico TIC en tiempo 0 horas (Azul) y después de 12 horas (rojo) de preparada la solución de dímmero crudo. (B) Espectro ESI-QTOF a:  $t_R$  4.3 min, la ampliación muestra la distribución isotópica del pico base. (C) Espectro ESI-QTOF a  $t_R$  4.4 min, el pico base corresponde a la especie carboxilada.

En la Figura 17C, para determinar la masa del subproducto, primero se determinó la carga de la molécula a partir de la distribución isotópica y posteriormente se calculó la masa y el error de masa como:

$$\Delta m/z = \frac{1}{n} \quad [17]$$

$$n = \frac{1}{(384.1980 - 384,0312)} \approx 6$$

$$M = (384,0312 \times 6) - (6 \times 1,0078) = 2298.1404$$

$$\text{Error de masa} = \frac{\Delta m}{m} \quad [18]$$

$$\text{Error de masa} = \frac{(2298,2558 - 2298,1404)}{2298,2558} \times 10^6 = 50 \text{ ppm}$$

La diferencia entre la masa de la especie sin carboxilación y la especie carboxilada se muestra en el espectro como 7,3449, multiplicada esta cantidad por la carga de +6, se obtiene la masa de 44.0694, correspondiente al CO<sub>2</sub>. Para la descarboxilación completa del dímero fue necesario disolver el péptido el crudo en agua-TFA 0,05% por 24 horas, luego congelar y liofilizar el péptido.

## 6.4 Etapa 4. Validación de la metodología para determinar el contenido de agua por Karl Fischer

### 6.4.1 Selectividad

Para determinar el contenido de agua por el método de Karl-Fischer se utilizó el método coulombimétrico. Para esto, se disolvió el péptido (10,0 mg/mL) en metanol y la medida se realizó cuatro veces y se compararon las respuestas obtenidas para el péptido respecto a ocho medidas de los blancos (metanol). Se evaluó por una

prueba t-student la diferencia entre la señal obtenida para el péptido y los blancos de metanol. Se descartó uno de los datos para el péptido por prueba Q de Dixon (ANEXO A).

La prueba t dio como resultado un valor-p de  $9,558 \times 10^{-5}$ , comparado con un  $\alpha=0,05$ , se concluye que sí hay una diferencia significativa entre las señales obtenidas para el péptido y el blanco; se concluye que se cumple con el parámetro de la selectividad. Se presenta el boxplot de los datos en la Figura 18.

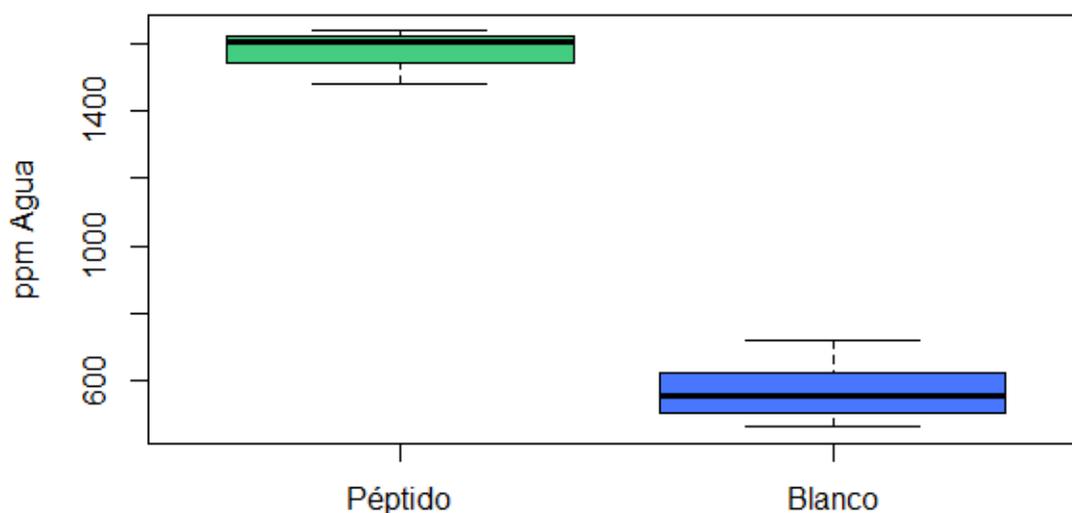


Figura 18 Boxplot de las medidas del péptido y de los blancos de metanol para la evaluación de selectividad del método de Karl Fischer.

### 6.4.2 Linealidad

Se evaluó la linealidad a partir de curvas a bajas y altas cantidades de agua. Los “ $\mu\text{g}$  de agua adicionados” fueron calculados con la cantidad de muestra adicionada y la concentración indicada por el certificado de análisis del material de referencia y los “ $\mu\text{g}$  de agua adicionados” fue la respuesta instrumental. Los resultados se muestran en la Figura 19. Intervalo de trabajo: 230,1 – 976,9  $\mu\text{g}$   $\text{H}_2\text{O}$  (altas cantidades), 14,7 – 93,1  $\mu\text{g}$   $\text{H}_2\text{O}$  (bajas cantidades).

Aunque ambas curvas tienen comportamiento lineal creciente, la curva a bajas cantidades de agua tiene problemas de sesgo, ya que la respuesta obtenida en cada adición difiere hasta un 22,7% de los  $\mu\text{g}$  de agua adicionados. La tabla de las mediciones realizadas con el porcentaje de sesgo se muestra en el ANEXO A.

En la Tabla 11, se resumen los resultados de la pendiente e intercepto para cada curva junto con el valor-p, el estadístico-F y el valor de  $R^2$ . De manera general, tanto para la curva de bajas como de altas cantidades de agua, se encontró a un  $\alpha=0.05$  que el intercepto es no significativo (igual a cero), que la pendiente es significativa (diferente de cero) y hay regresión lineal por el valor-p del estadístico-F. Adicionalmente, los valores de  $R^2$  son mayores a 0,999, por lo que se pueden considerar aceptables según la FDA, que establece valores de  $R^2$  aceptables mayores a 0,995 (49).

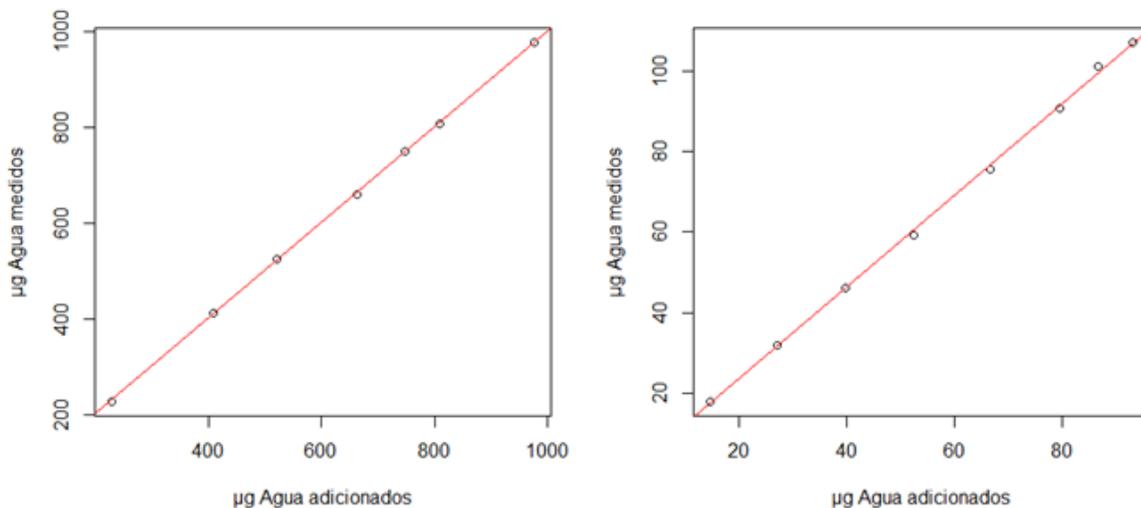


Figura 19 Curvas de calibración a altas cantidades de agua (izquierda) y bajas cantidades de agua (derecha).

Tabla 12 Resumen de resultados linealidad método Karl Fischer.

<b>Altas cantidades H<sub>2</sub>O</b>	<b>Estimado</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Intercepto</b>	1,976961	0,585
<b>Pendiente</b>	0,997645	6.59x10 <sup>-11</sup>
<b>R<sup>2</sup> = 0,9999</b>	Estadístico F	6.59x10 <sup>-11</sup>
<b>Bajas cantidades H<sub>2</sub>O</b>	<b>Estimado</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Intercepto</b>	0,84327	0,372
<b>Pendiente</b>	1,13727	2.12x10 <sup>-10</sup>
<b>R<sup>2</sup> = 0,9991</b>	Estadístico F	2.12x10 <sup>-10</sup>

En el análisis de residuales de las curvas de calibración se observa un comportamiento aleatorio en la curva de altas cantidades de agua (Figura 20, izquierda); por otro lado, los residuales de la curva de bajas cantidades (Figura 20, derecha) presenta una tendencia similar a una función polinómica (a excepción del penúltimo punto). De estas gráficas se puede concluir que se cumple la independencia del error en la curva de altas cantidades de agua, mientras que para la curva de bajas cantidades no.

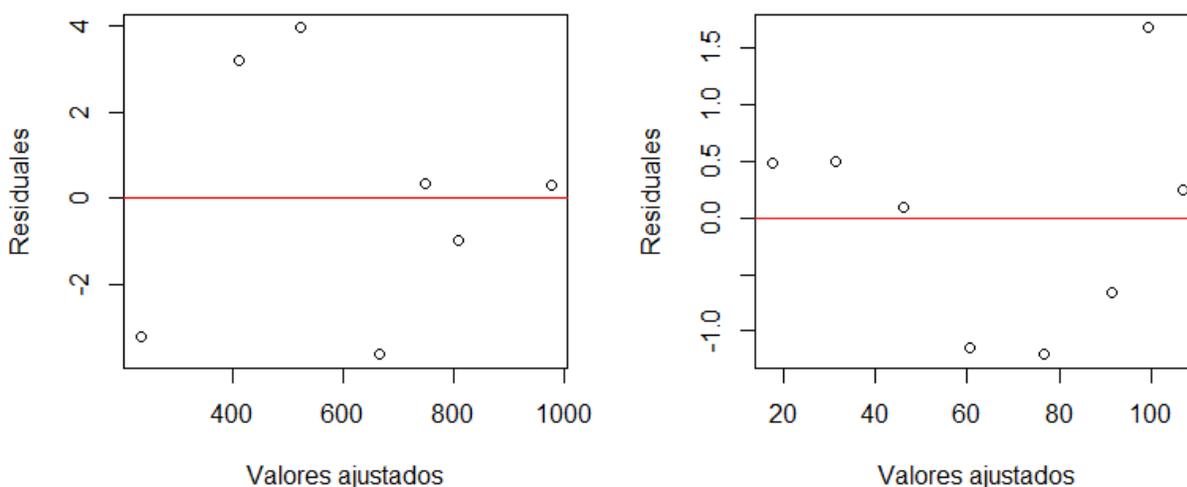


Figura 20 Gráficas de residuales de las curvas a altas cantidades de agua (izquierda) y bajas cantidades de agua (derecha).

Se evaluó la normalidad de los residuales aplicando la prueba de Shapiro-Wilk y gráficas Q-Q (ANEXO A). La prueba de Shapiro dio como resultado un valor-p de 0,5462 para la curva a altas cantidades de agua y 0.5335 para la curva a bajas concentraciones. De esto se puede concluir que ambas curvas cumplen con el supuesto de normalidad de residuales.

De los resultados obtenidos para evaluar la linealidad de las curvas construidas, se puede concluir que la curva a altas cantidades de agua es la que cumple con los supuestos evaluados (independencia del error, normalidad de residuales); por su parte, la curva a bajas cantidades de agua presenta problemas en la independencia del error, además, presenta alto porcentaje de sesgo en cada adición realizada. Este resultado es muy importante, ya que indica que al trabajar a cantidades bajas de agua no se puede confiar en la medida absoluta del contenido de agua medido, sino que se necesitaría previamente realizar una curva de calibración, lo cual hace que el trabajo sea más dispendioso, ya que el análisis por cada muestra requiere un tiempo de al menos 7 minutos para homogenizar la mezcla de la muestra, realizar la medición y que se equilibre el sistema para realizar la siguiente inyección. Por otro lado, trabajar con una cantidad mayor de agua se puede confiar en la medida absoluta del contenido de agua en la muestra, sin necesidad de hacer una curva de calibración, haciendo el proceso más económico y rápido. Sin embargo, si la muestra tiene poco contenido de agua y es una muestra costosa (como es el péptido utilizado en este trabajo) haría el proceso de medición más costoso al obligar a agregar más cantidad de muestra para alcanzar el intervalo de medida.

#### **6.4.3 Veracidad y Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)**

Para la evaluación de la veracidad y la precisión intermedia, se realizaron siete medidas del estándar de agua 0,01% en condiciones de repetibilidad y de 6 a 7

medidas del estándar de agua 1,0% a 3 niveles de masa en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13 Resumen de resultados de Veracidad y Precisión para la determinación del contenido de agua por Karl Fischer. D2 = día 2.

Muestra	Promedio $\mu\text{g H}_2\text{O}$ adicionados	Promedio $\text{mg/kg H}_2\text{O}$	CV $\text{mg/kg}$ $\text{H}_2\text{O}$ (%)	$\text{mg/kg}$ real MRC	% sesgo
<b>0,01%</b>	41,15	124,01	1,62	100	24,0
<b>1% Bajo</b>	173,01	9600,40	5,60	10040	4,38
<b>1% Medio</b>	544,02	9955,62	1,48	10040	0,840
<b>1% Alto</b>	840,20	10379,47	2,65	10040	3,38
<b>1% Medio D2</b>	596,52	9837,21	0,814	10040	2,02

Con respecto a la veracidad del método, se puede observar que el “% sesgo” en la Tabla 13, los resultados para el estándar de agua 0,01% y los niveles de masa bajo y alto son los resultados con el mayor porcentaje de sesgo, en especial el resultado para el 0,01% donde se obtuvo 24,0% de sesgo. Este resultado concuerda con lo observado para la linealidad a bajas cantidades de agua, donde también se presentaron problemas de sesgo.

Respecto a los resultados de veracidad para los niveles bajo y alto, estos indican que trabajar a estas cantidades de masa trae consigo problemas de sesgo de hasta el 4,38% (nivel bajo). Entonces, para efectos prácticos, se prefiere trabajar a niveles medios de masa (alrededor de 500-600  $\text{mg/kg}$ ) que brindan la confianza de un resultado veraz. Sin embargo, en un estudio previo en el que se validó una metodología de Karl Fischer coulombimétrico (74), el criterio de aceptación para la veracidad se estableció en máximo el 5%, por lo que los análisis realizados al 1% cumplen con la veracidad.

Para corroborar los resultados de veracidad y cumplir los requisitos de precisión del método según la USP, se presentan los resultados de la prueba t-student junto con el intervalo de confianza al 95% en la Tabla 14.

Tabla 14 Resultados prueba t para cada nivel de masa junto con el intervalo de confianza al 95%.

<b>Muestra</b>	<b>Promedio mg/kg H<sub>2</sub>O</b>	<b>Intervalo de confianza (95%)</b>	<b>Prueba t Valor-p</b>
<b>0,01%</b>	124,01	122,15 – 125,87	6,681x10 <sup>-8</sup>
<b>1% - Bajo</b>	9600,40	9036,52 – 10164,28	0,1014
<b>1% Medio</b>	9955,62	9800,97 – 10110,28	0,2197
<b>1% Alto</b>	10379,47	10125,26 – 10633,67	0,01708
<b>1% Medio D2</b>	9837,21	9763,07 – 9911,35	0,0005396

Los datos obtenidos muestran que los únicos que cumplen con la prueba t son los resultados para 1% bajo y medio, es decir, se rechaza  $H_1$  y se dice que la media de la muestra es estadísticamente igual al valor del MRC (10400 mg/kg). Por otro lado, los demás resultados no cumplen con esta prueba, lo que quiere decir que a un  $\alpha=0,05$  se rechaza  $H_0$  y se concluye que la media de la muestra no es estadísticamente igual al valor de concentración del MRC. Este resultado es más un indicativo de posición de distribución de los datos respecto a la media real que una prueba de veracidad, ya que, por ejemplo, el resultado en “1% Medio D2” no cumple con la prueba t pero tiene un % de sesgo menor que el resultado para “1% Bajo” que sí cumple con la prueba t. Es decir, los datos en “1% Bajo” están distribuidos de tal manera que logran incluir el valor de 10400 ppm, pero el resultado de “1% Medio D2” tiene un intervalo de confianza menor, lo que quiere decir que los datos tienen menor dispersión y no incluyen el valor de 10400 ppm.

Respecto a la precisión, se calculó el CV para cada muestra y se encontró que la mejor precisión fue en el nivel “1% Medio”, ya que tiene los valores más bajos de CV en condiciones de repetibilidad. Adicionalmente, en condiciones de precisión intermedia, este nivel logra tener el menor CV de todos los resultados.

Según la AOAC (75), los CV aceptable para muestras de concentración 1% 0,01% son 2,7% y 5,3%, respectivamente. Comparando estos valores con los obtenidos experimentalmente, todos los niveles de masa cumplen con esta especificación excepto el nivel 1% Bajo; sin embargo, en un estudio previo (74), se estableció que el límite de aceptación para la repetibilidad debe ser menor al 10%, con lo cual el nivel 1% Bajo cumpliría también con la repetibilidad.

También se realizó un análisis de homogeneidad de varianzas entre el día 1 y 2 para el nivel 1% Medio por prueba de Bartlett y se obtuvo un valor-p de 0,1786, lo cual indica que la varianza en los resultados es homogénea entre los dos días de análisis.

#### **6.4.4 Robustez**

La robustez se evaluó aplicando un arreglo factorial  $2^3$  (tabla completa del arreglo factorial se muestra en (ANEXO A), Los factores seleccionados para este estudio fueron:

1. Cantidad de muestra medida en “Número de gotas”: 20 (-) y 40 (+)
2. Tiempo de agitación: 3 min (-) y 5 min (+)
3. Velocidad de agitación: 2 (-) y 4 (+)

Dado que en este ensayo no se realizaron réplicas por cada medición, se aplicó el método de Daniel (76) utilizando R. Los resultados se muestran en la Figura 21, en esta gráfica, los factores e interacciones que se encuentran señalados se consideran significativos o “no robustos”; es decir, los factores Tiempo, Gotas y la interacción Gotas: Tiempo son críticos para el método.

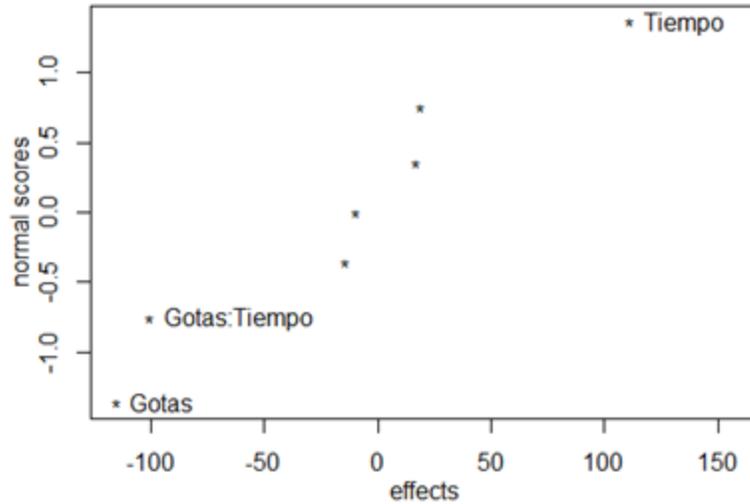


Figura 21 Gráfica de Daniel para la evaluación de la robustez. Los factores e interacciones fuera de la diagonal se consideran no robustos o variables críticas.

Además de la gráfica de Daniel, se puede obtener la gráfica de efectos principales (Figura 22). En esta gráfica, los factores que presenten líneas diagonales indican que el factor es crítico y líneas horizontales que la variable no es crítico o es robusto.

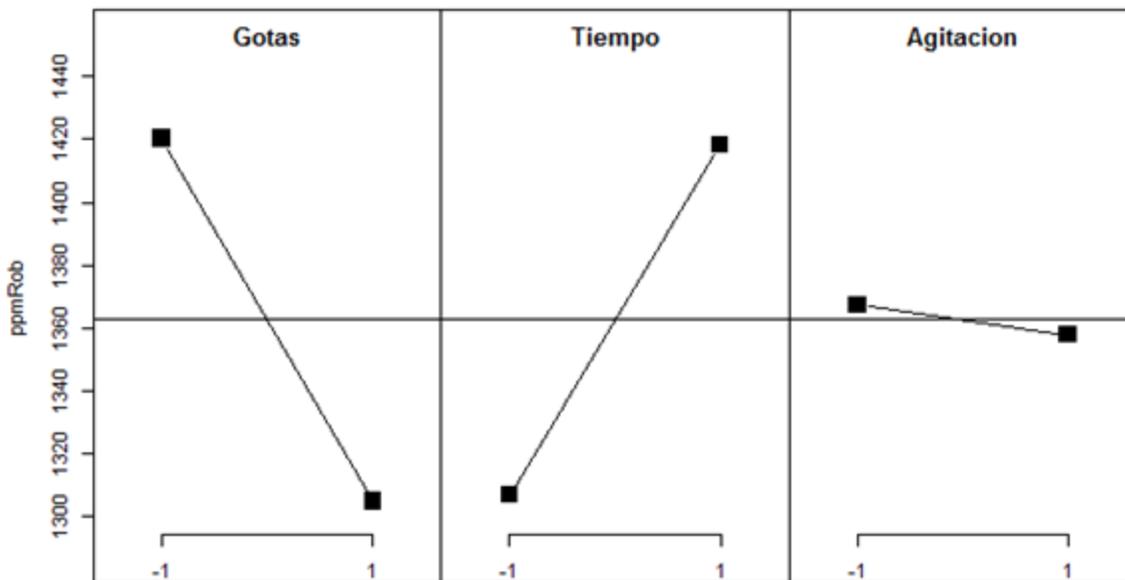


Figura 22 Gráfica de efectos principales para la validación del contenido de agua por Karl Fischer.

Del estudio de robustez se puede concluir que el método es robusto para el factor “Agitación” junto con las interacciones de Agitación:Tiempo y Agitación:Gotas.

Asimismo, los factores “Gotas”, “Tiempo” y la interacción “Gotas:Tiempo” se consideran críticos.

#### **6.4.5 Contenido de agua en el péptido**

El valor de contenido de agua en el péptido puede ser obtenido de los valores obtenidos del estudio de selectividad del método. Para obtener el contenido de agua se deben restar el promedio del contenido de agua para el péptido disuelto en metanol (0,157%) con los blancos de metanol (0,057%): la resta da como resultado 0,100% de agua en el péptido con incertidumbre expandida U de  $\pm 0,013\%$  con un factor de cobertura  $k = 2$ . El procedimiento para la estimación de la incertidumbre es descrito en el ANEXO D.

### **6.5 Etapa 5. Validación de la metodología para la determinación del contenido de TFA residual por HPLC**

#### **6.5.1 Selectividad**

La selectividad fue evaluada utilizando cromatografía HPLC con detector DAD. Se determinó la pureza del pico correspondiente al ácido trifluoroacético (TFA) analizado junto con un compuesto de estructura similar (ácido acético) (Figura 23); Adicionalmente, se analizó el TFA en matriz, solución del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, (Figura 24). En ambos casos se obtuvieron purezas de pico de 1.000, correspondiente a un pico 100% puro. Se concluye que el método es selectivo para

el TFA al no tener coelución con la molécula de estructura similar ni con ningún componente de la matriz.

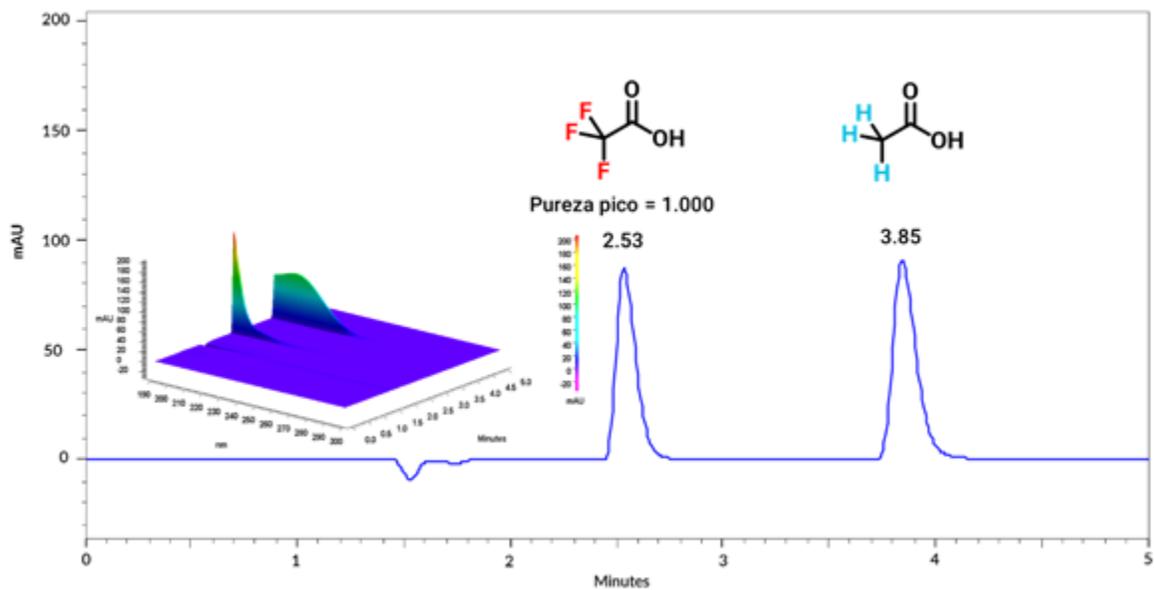


Figura 23 Mezcla de TFA (tr 2.53 min) con ácido acético (tr 3.85 min) con pureza de pico y cromatograma 3D 190-300 nm.

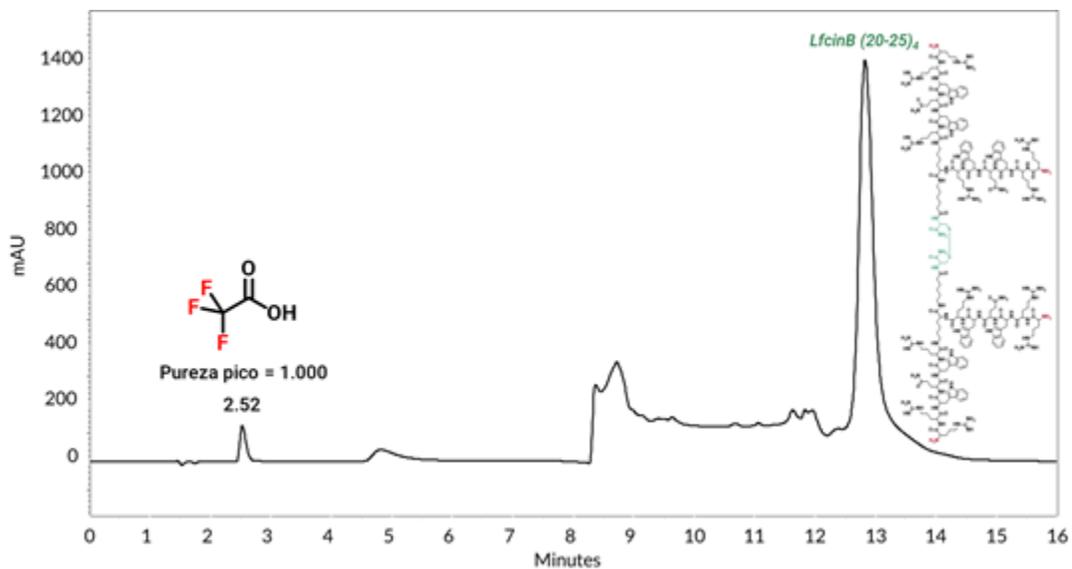


Figura 24 TFA (tr 2.52 min) analizado en matriz (péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>) con pureza de pico.

## 6.5.2 Linealidad – Exploratorio

Se realizó un estudio exploratorio para la determinación del intervalo lineal, intervalo dinámico y punto de saturación. Se encontró que el intervalo lineal se encuentra entre 0,10 y 1,00 mg/g de TFA y la saturación de la señal se encuentra alrededor de 18,0 mg/g de TFA (Figura 25).

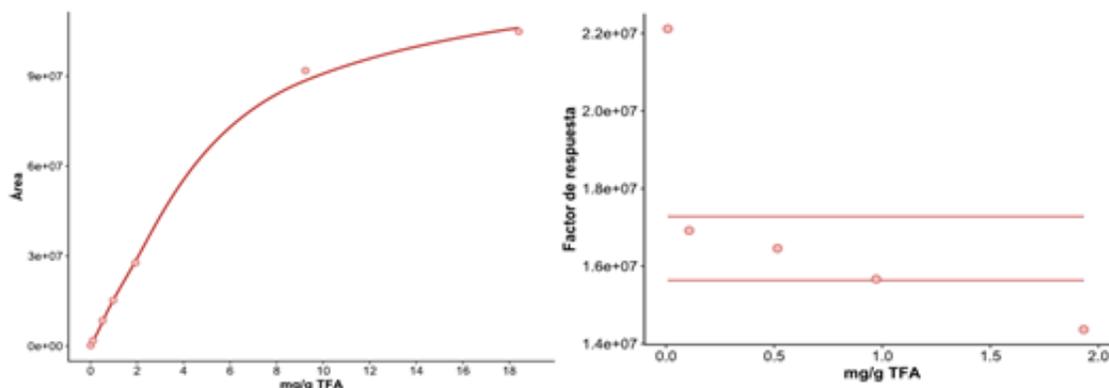


Figura 25 (izquierda) Gráfica de área en función de la concentración de TFA, saturación a 18,0 mg/g de TFA; (derecha) gráfica del factor de respuesta en función de la concentración de TFA, intervalo lineal de 0,10 hasta 1,00 mg/g de TFA.

## 6.5.3 Linealidad

Se construyó una curva de calibración en el intervalo de 0,10 hasta 0,70 mg/g de TFA. Se evaluó la linealidad de los resultados obtenidos aplicando un modelo lineal y cuadrático. Los resultados se muestran en la Figura 26 y Tabla 15.

Tabla 15 Resumen resultados aplicación del modelo lineal y cuadrático para el TFA a 195 nm.

Modelo	B <sub>0</sub> (valor-p)	β <sub>1</sub> (valor-p)	β <sub>2</sub> (valor-p)	Estadístico F	Lack of fit
<b>Lineal</b>					
y = β <sub>0</sub> + β <sub>1</sub> x	297646 (1,37x10 <sup>-11</sup> )	-1409114,28 (< 2,2x10 <sup>-16</sup> )	--	< 2,2 x10 <sup>-16</sup>	4,572 x10 <sup>-16</sup>
R <sup>2</sup> = 0,9994					16
<b>Cuadrático</b>					
y = β <sub>0</sub> + β <sub>1</sub> x + β <sub>2</sub> x <sup>2</sup>	-53040 (0,00161)	16798799 (< 2,2x10 <sup>-16</sup> )	-2005488 (< 2,2x10 <sup>-16</sup> )	< 2,2 x10 <sup>-16</sup>	0,09704
R <sup>2</sup> ajustado = 0,9999					

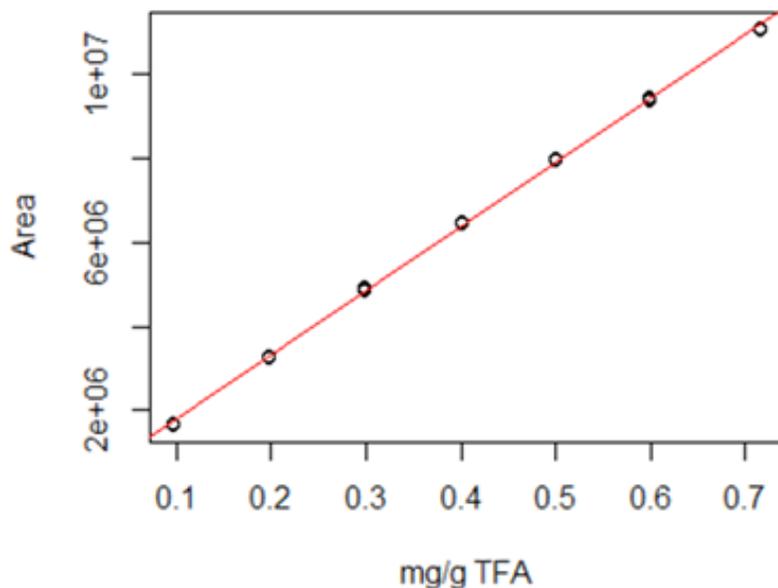


Figura 26 Gráfica linealidad de TFA. Intervalo de trabajo 0,10 – 0,70 mg/g de TFA.

De la aplicación del modelo lineal y cuadrático, aquel que tuvo mayor ajuste a los datos fue el modelo cuadrático, al presentar un  $R^2$  más alto y al presentar un lack of fit no significativo a un  $\alpha = 0,05$ . El modelo lineal, aunque es un modelo más sencillo, presentó un lack of fit significativo a un  $\alpha = 0,05$ .

Se realizó la gráfica de residuales para los modelos lineal y cuadrático. Los resultados se muestran en la Figura 27. Los residuales en el modelo lineal muestran una tendencia similar a una parábola, mientras que los residuales del modelo cuadrático muestran el comportamiento aleatorio deseado, demostrando así que el modelo que cumple con la independencia del error es el modelo cuadrático.

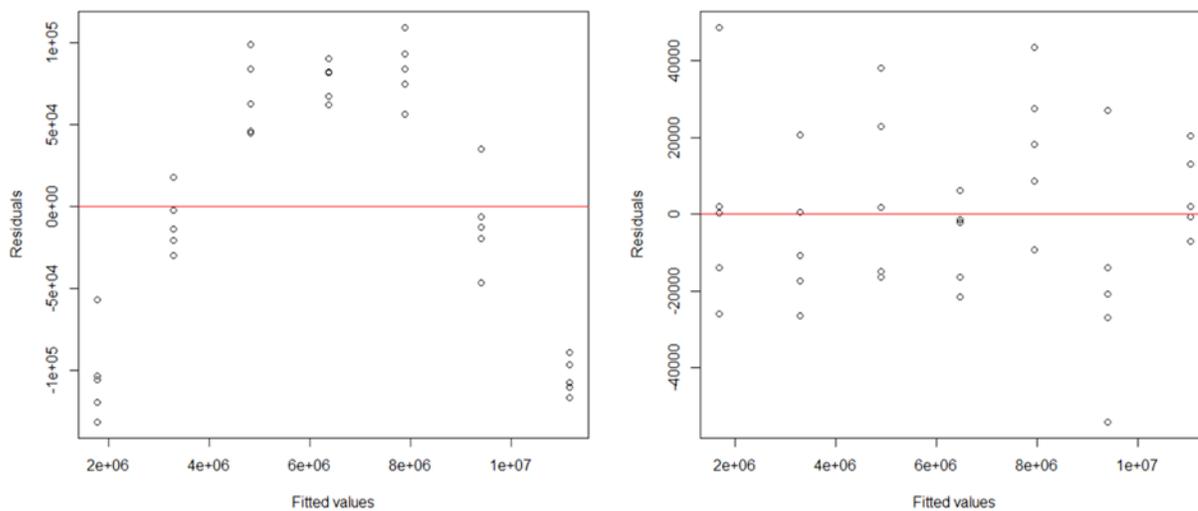


Figura 27 Gráfica de residuales para el modelo lineal (izquierda) y el modelo cuadrático (derecha). La normalidad de los residuales se evaluó por gráficas Q-Q (Figura 28). Los residuales que tienen una distribución normal son los residuales del modelo cuadrático, ya que la mayoría de los puntos se encuentran en la línea de tendencia.

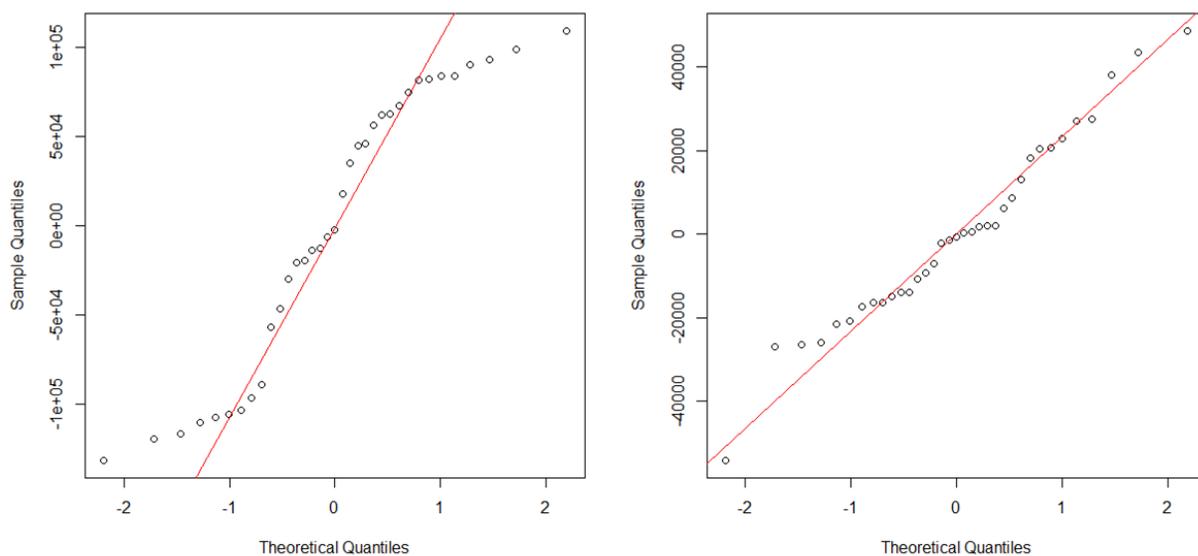


Figura 28 Gráficas Q-Q de los residuales de los modelos lineal (izquierda) y cuadrático (derecha).

### 6.5.4 Límite de detección y cuantificación

Para la determinación del límite de detección y cuantificación, se construyó una curva de calibración a bajas concentraciones de 0,02 a 0,10 mg/g de TFA. La curva se presenta en la Figura 30.

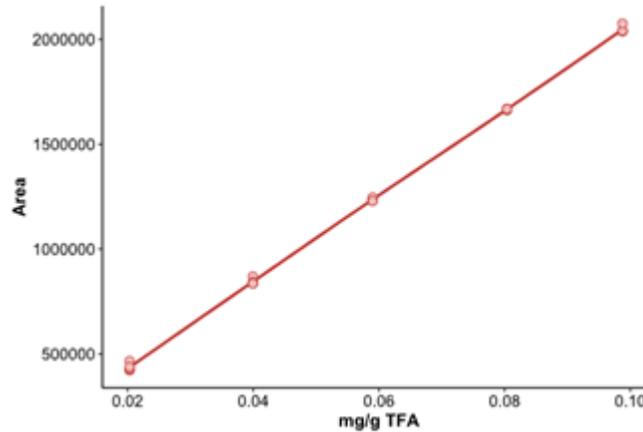


Figura 29 Curva de calibración a bajas concentraciones de TFA. Intervalo de trabajo: 0,02-1,00 mg/g.

A partir de esta regresión lineal, se obtuvo el error en el intercepto “ $S_b$ ” y la pendiente “ $a$ ”, se calculó el LOD y LOQ aplicando la fórmula

$$LOD = \frac{3,3S_b}{a} \quad [3]$$

$$LOD = \frac{3,3 \times 5959}{20490203} = 0,0009 \text{ mg/g TFA}$$

$$LOQ = \frac{10S_b}{a} \quad [4]$$

$$LOQ = \frac{10 \times 5959}{20490203} = 0,003 \text{ mg/g TFA}$$

De acuerdo con los resultados, el LOQ se encuentra a una concentración 6,7 veces menor que el punto más bajo de la curva de calibración a bajas concentraciones, es decir, esta metodología es altamente sensible para la cuantificación y detección de TFA en una muestra. Sin embargo, el contenido del TFA esperado para los péptidos se encuentra a mayores niveles de concentración, por lo que la curva empleada de altas concentraciones es la adecuada para la cuantificación del TFA en los péptidos.

### 6.5.5 Repetibilidad y precisión intermedia

Para la evaluación de la repetibilidad instrumental, se tomaron los datos de área de la curva de calibración a 3 niveles de concentración, los resultados se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16. Resultados de repetibilidad instrumental para el TFA

Repetición	Nivel mg/g TFA		
	Bajo (0,0974 mg/g)	Medio (0,401 mg/g)	Alto (0,715 mg/g)
1	1718186	6438471	11039588
2	1655714	6443509	11042221
3	1669743	6458406	11033295
4	1671548	6457704	11060607
5	1643714	6466066	11053369
<b>Promedio</b>	1671781	6452831	11045816
<b>SD</b>	28300	11436	11004
<b>CV (%)</b>	1,69	0,18	0,10

Los resultados muestran que el nivel bajo presentó el mayor CV; sin embargo, como este se encuentra por debajo de 2% se considera aceptable. Los niveles medio y alto tuvieron mejor repetibilidad al mostrar valores de CV inferiores a 0,2%.

Para la evaluación de la repetibilidad del método y precisión intermedia (Inter días) del método, se prepararon cinco soluciones de TFA, del péptido puro y del péptido crudo. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17 Resultados de repetibilidad del método y precisión intermedia inter-días para el TFA.

<b>Día #1</b>		<b>mg/g TFA</b>	
<b>Repetición</b>	<b>Solución de TFA</b>	<b>Péptido puro</b>	<b>Péptido crudo</b>
1	0,236	0,208	0,403
2	0,227	0,324	0,330
3	0,221	0,266	0,332
4	0,216	0,293	0,336
5	0,229	0,250	0,304
<b>Promedio</b>	0,226	0,268	0,341
<b>SD</b>	0,008	0,044	0,037
<b>CV (%)</b>	3,43	16,41	10,80
<b>Día #2</b>		<b>mg/g TFA</b>	
<b>Repetición</b>	<b>Solución de TFA</b>	<b>Péptido puro</b>	<b>Péptido crudo</b>
1	0,238	0,259	0,373
2	0,240	0,265	0,413
3	0,232	0,284	0,335
4	0,240	0,259	0,355
5	0,242	0,324	0,382
<b>Promedio</b>	0,238	0,278	0,372
<b>SD</b>	0,004	0,028	0,029
<b>CV (%)</b>	1,59	9,96	7,84

Los resultados mostraron valores de CV comprendidos entre 1,59% hasta 16,41%, los valores más altos de CV se obtuvieron para las muestras del péptido, particularmente en el producto puro. Estos valores tan altos en los péptidos puro y crudo pueden considerarse normales debido a la pequeña cantidad de péptido pesado en cada ensayo (1,00 mg), manipular una cantidad tan pequeña de muestra puede comprometer la precisión, ya que la incertidumbre expandida de la balanza

al nivel de 1-100 mg es de 0,07 mg ( $k=2$ ), pesando una muestra de 1,00 mg tendría una incertidumbre de la medida del 7%, respecto a una masa mayor, por ejemplo, 10,00 mg tendría 0,7% de incertidumbre. Cabe resaltar que no fue posible usar una mayor cantidad de muestra debido al elevado costo del péptido.

Según la AOAC (75), el CV aceptable debe ser inferior al 5,3% para el nivel de concentración de 100 mg/kg. Las soluciones del TFA cumplen con la precisión al tener valores de CV inferiores al reportado, pero para el péptido puro y crudo no se cumple por lo discutido anteriormente respecto a la cantidad de muestra pesada. Estos datos también se representaron en Boxplot (Figura 30) para representar visualmente la diferencia entre los grupos

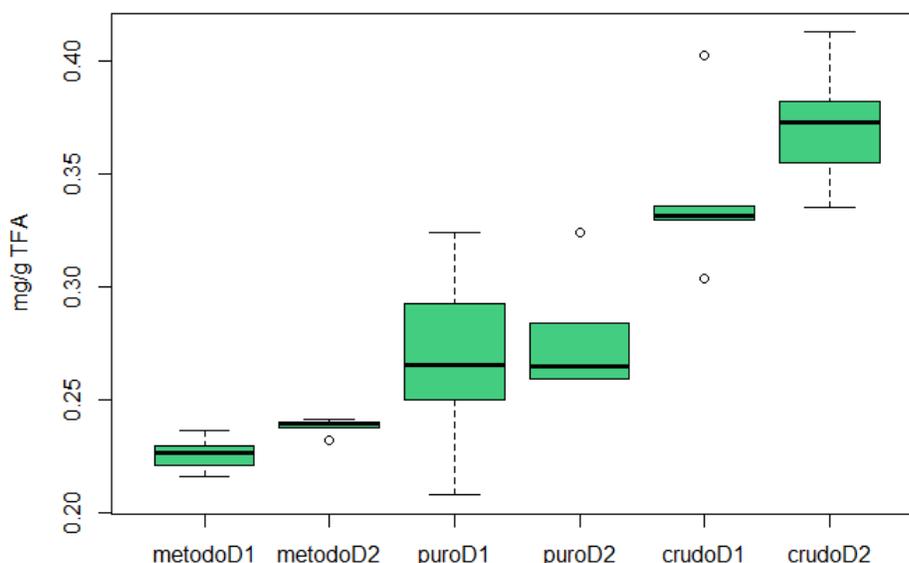


Figura 30 Boxplot de los resultados de repetibilidad y precisión intermedia. D1 = día 1; D2 = día 2. En el Boxplot es más notorio el mayor contenido de TFA en el péptido crudo que en el puro, esto debido a que en la purificación del péptido por SPE, el péptido es sembrado en la columna y después la columna es lavada con agua para remover las sales y, en este proceso, se remueve también parte del TFA que tenía adsorbido el sólido.

Se realizó la prueba de Bartlett para la homogeneidad de varianzas entre días para cada muestra (solución de TFA, péptido puro y péptido crudo). Los valores-p obtenidos por cada grupo fueron:

- Solución de TFA: 0,1939
- Péptido puro: 0,3914
- Péptido crudo: 0,6601

Comparado con un  $\alpha=0,05$  se rechaza  $H_0$  y se concluye que las varianzas entre días del contenido de TFA en los tres grupos son homogéneas.

### 6.5.6 Veracidad: Sesgo como porcentaje de recuperación

El sesgo fue evaluado como porcentaje de recuperación de TFA subrogado en Glicina bajo condiciones de repetibilidad. Los resultados se encuentran dentro del intervalo aceptado de 95-105%, cumpliendo así con el parámetro de veracidad. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18 Resultados de Exactitud de TFA expresado como porcentaje de recuperación de TFA subrogado en glicina.

Repetición	Nivel mg/g TFA		
	Bajo (0,0985 mg/g)	Medio (0,219 mg/g)	Alto (0,693 mg/g)
1	0,100	0,225	0,719
2	0,102	0,227	0,721
3	0,101	0,228	0,722
4	0,100	0,228	0,723
5	0,101	0,227	0,720
<b>Promedio</b>	0,101	0,227	0,721
<b>Recuperación (%)</b>	102,5	103,7	104,0

### 6.5.7 Robustez

Se evaluó la robustez aplicando un arreglo factorial  $3^3$  junto con la visualización de datos por medio de la metodología de superficies de respuesta, que involucra la implementación de un modelo cuadrático. Los factores y niveles evaluados fueron:

- Longitud de onda (nm): 190 (-1), 195 (0), 200 (+1)
- Fuerza iónica (mM): 15,0 (-1), 20,0 (0), 25,0 (+1)
- Flujo (mL/min): 1,80 (-1), 2,00 (0), 2,20 (+1)

En este modelo cuadrático, se evalúa la significancia de cada uno de los factores y sus interacciones (un factor o interacción se consideran “robustos” cuando no son significativos para el modelo). Los resultados de la significancia de los factores se muestran en la Tabla 19 y las superficies de respuesta obtenida se muestran en la Figura 31.

Tabla 19 Resultados del valor estimado de cada factor e interacción para el modelo cuadrático junto con el valor-p.

	<b>Estimado</b>	<b>Valor-p</b>
<b>(intercepto)</b>	2567189,12	$<2,2 \times 10^{-16}$
<b>Longitud de onda</b>	-1409114,28	$<2,2 \times 10^{-16}$
<b>Fuerza iónica</b>	26304,06	<b>0,0201437</b>
<b>Flujo</b>	-469407,67	$<2,2 \times 10^{-16}$
<b>Longitud de onda: Fuerza iónica</b>	-917,33	<b>0,9440871</b>
<b>Longitud de onda:Flujo</b>	272320,00	$<2,2 \times 10^{-16}$
<b>Fuerza iónica:Flujo</b>	4322,75	<b>0,7413038</b>
<b>Longitud de onda<sup>2</sup></b>	-215183,74	$2,29 \times 10^{-9}$
<b>Fuerza iónica<sup>2</sup></b>	-112022,74	$5,23 \times 10^{-4}$
<b>Flujo<sup>2</sup></b>	74100,76	0,0001551

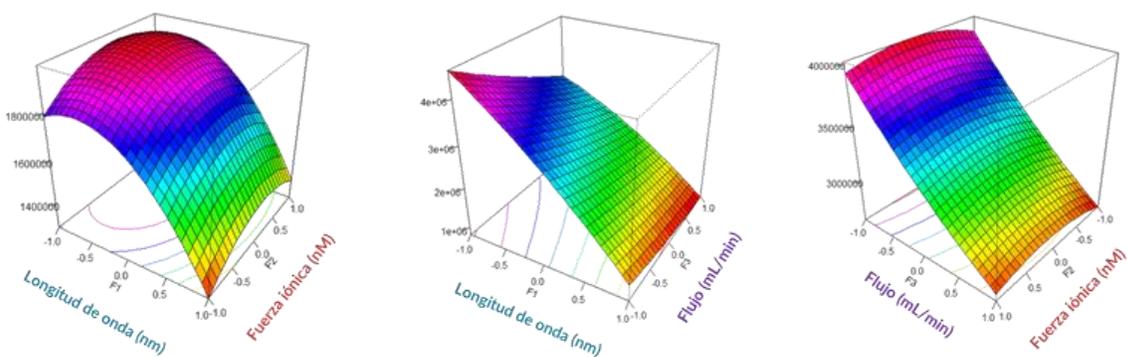


Figura 31 Superficies de respuesta para las interacciones: A) longitud de onda:Fuerza iónica; B) Longitud de onda:Flujo; C) Flujo:Fuerza iónica.

De estos resultados se puede concluir que la fuerza iónica es el factor que tiene menos significancia entre los otros factores evaluados, este sería no significativo o “robusto” considerando un  $\alpha = 0,01$  (pero sí sería no robusto a un  $\alpha = 0,05$ ). Adicionalmente, las interacciones de la fuerza iónica con los otros factores (flujo y longitud de onda) resultaron ser robustas al ser no significativas a un  $\alpha = 0,05$ ; sin embargo, la interacción “flujo:fuerza iónica” se considera significativa ya que, según las superficies de respuesta (Figura 31), no se alcanza un máximo o un mínimo en el punto 0,0 de la gráfica. Por su parte, la interacción “longitud de onda:fuerza iónica” sí es robusta ya que la superficie de respuesta sí alcanza el máximo cerca del punto 0,0. La interacción “longitud de onda:flujo” se considera no robusta, tanto por los resultados obtenidos del análisis estadístico como por la superficie de respuesta de esta interacción.

### 6.5.8 Porcentaje de TFA en el péptido

Se calculó el % de TFA en el péptido a partir de los datos obtenidos de la repetibilidad del método y precisión intermedia. Se presenta una muestra de cálculos a continuación:

$$1,00018 \text{ g solución} \times \frac{0,266 \text{ mg TFA}}{1,0 \text{ g solución}} \times \frac{100\%}{1,05 \text{ mg péptido}} = 25,3\% \text{ TFA}$$

Se realizó este cálculo para cada una de las determinaciones, el promedio de porcentaje de TFA en el péptido fue de 25,7% con un CV de 12,6%. Se estimó la incertidumbre para esta medición y se obtuvo como resultado una incertidumbre expandida U de 6,2% con un factor de cobertura k de 2. El cálculo de la estimación de la incertidumbre se muestra en el ANEXO D.

## 6.6 Etapa 6. Validación de la metodología para la determinación del contenido del péptido por RP-HPLC.

### 6.6.1 Selectividad

El método de análisis implementado en esta etapa es el mismo método diseñado en la Etapa 1 a partir de la ecuación del  $k^*$  para la columna monolítica Chromolith HighResolution RP-18e (50 x 4,6 mm). Este método fue ajustado de 5-70%B en 11,5 min a 5-50%B en 8 min, conservando la misma pendiente para hacer el análisis más corto con la misma resolución en la separación del método original. La selectividad de este método se evaluó a partir de las posibles impurezas que pudiese tener el péptido; estas impurezas se obtuvieron a partir de las fracciones de purificación del

péptido dimérico, se mezclaron con el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> y se inyectaron. Los resultados por DAD a 210 nm se muestran en la Figura 32.

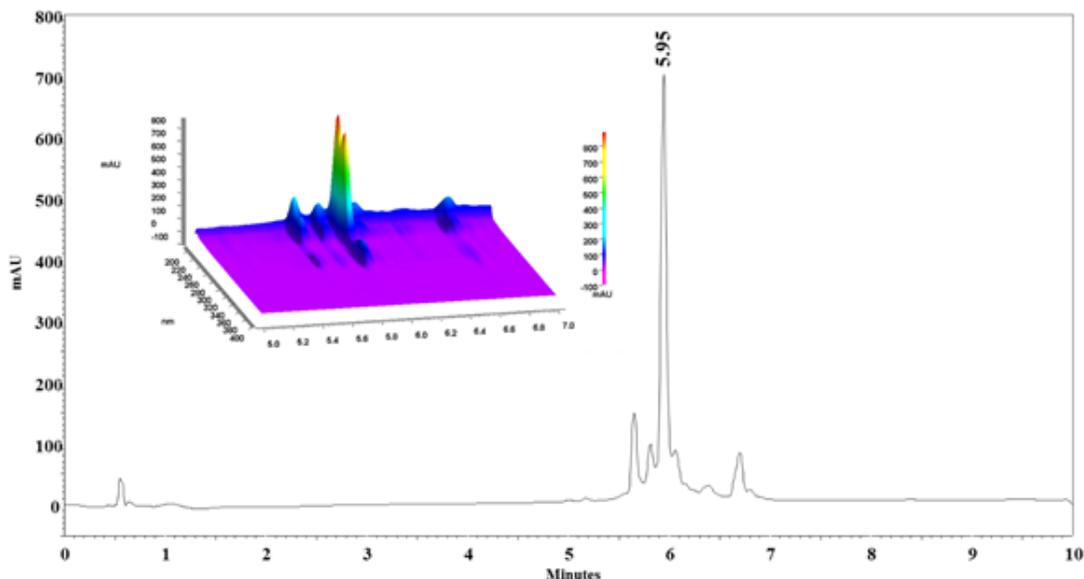


Figura 32 Perfil cromatográfico en 2D a 210 nm y en 3D de 200 a 400 nm de la mezcla péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> con impurezas del producto crudo. 5-50% B en 8 min, Fase móvil: Agua-TFA 0,05%:ACN-TFA 0,05% (solvente B).

Para el pico de  $t_R$  5,95 min, correspondiente al péptido tetramérico LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, se obtuvo una pureza de pico promedio de 0.9082 de 5 inyecciones, este resultado indica que el pico tiene 90,8% de pureza y el otro 9,2% corresponde a otro u otros compuestos presentes en la matriz que están coeluyendo con el péptido. Dado que esta pureza del pico es superior al 90%, se cumple con la selectividad del método.

Para continuar con la validación del método, se comparó el resultado obtenido por DAD respecto a otra técnica instrumental, se empleó UHPLC-QTOF para analizar la mezcla y gracias al análisis de masas, verificar la coelución de otras especies en el pico cromatográfico correspondiente al péptido.

Antes de analizar la mezcla por UHPLC-QTOF, el método fue optimizado empleando un UHPLC-DAD, debido a que los análisis por LC-MS son costosos y requieren el consumo de más reactivos como calibrantes, solventes y aditivos de fase móvil de grado LC-MS.

Inicialmente, para el análisis de LfcinB (20-25)<sub>4</sub> por UHPLC-DAD, en un equipo Thermo Dionex UltiMate 3000, se probaron las columnas Core-Shell. Sorpresivamente, los perfiles obtenidos mostraron ensanchamiento y baja intensidad lo cual sugería que estas columnas perdieron eficiencia para el análisis del tetrámero, debido posiblemente al tamaño o volumen de esta molécula, (Figura 1 Anexo B). Se decidió entonces ajustar el método empleando la columna monolítica, recordemos que, esta columna se venía trabajando a 2,00 mL/min (método 1), un flujo muy alto que no podía usarse en LC-MS.

Utilizando la misma columna monolítica para HPLC-DAD y haciendo uso de la ecuación de  $k^*$ , se transfirió el método original de 2,00 mL/min a 0,40 mL/min manteniendo el producto  $t_R k^*$  de 16,0 constante entre los dos métodos, obteniendo un método de 5-50 %B en 40 min. Dado que este nuevo método ofrecía mejor separación que el método inicial, se pudo disminuir el  $t_R$  de 40 a 30 min para aumentar la pendiente del gradiente, disminuyendo el tiempo de análisis al costo de resolución entre los picos. Una vez alcanzada la separación deseada, se cambió el %B inicial y final para obtener un método definitivo de 15-40 %B en 16,6 min. Los métodos desarrollados se presentan en la Figura 33.

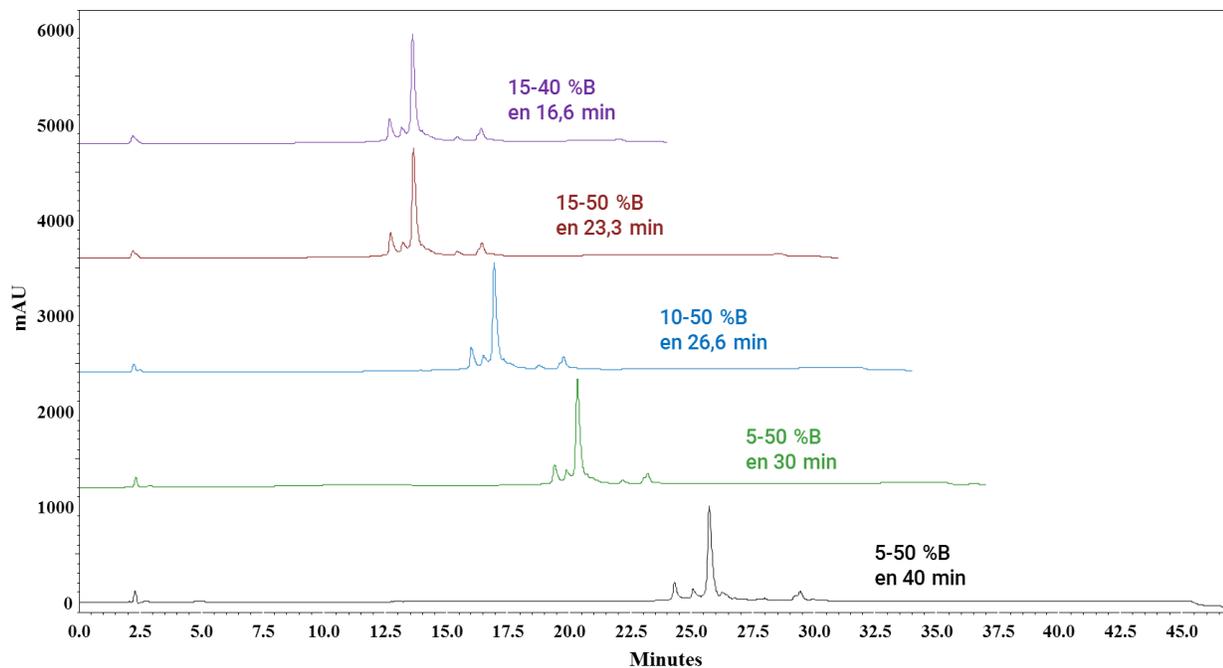


Figura 33 Optimización del método de análisis por HPLC-DAD a 210 nm para transferencia a UHPLC-QTOF.

Una vez optimizado el método de análisis, se inyectaron las muestras en el equipo LC-MS. Los TIC del péptido tetramérico y de la mezcla se presentan en la Figura 34.

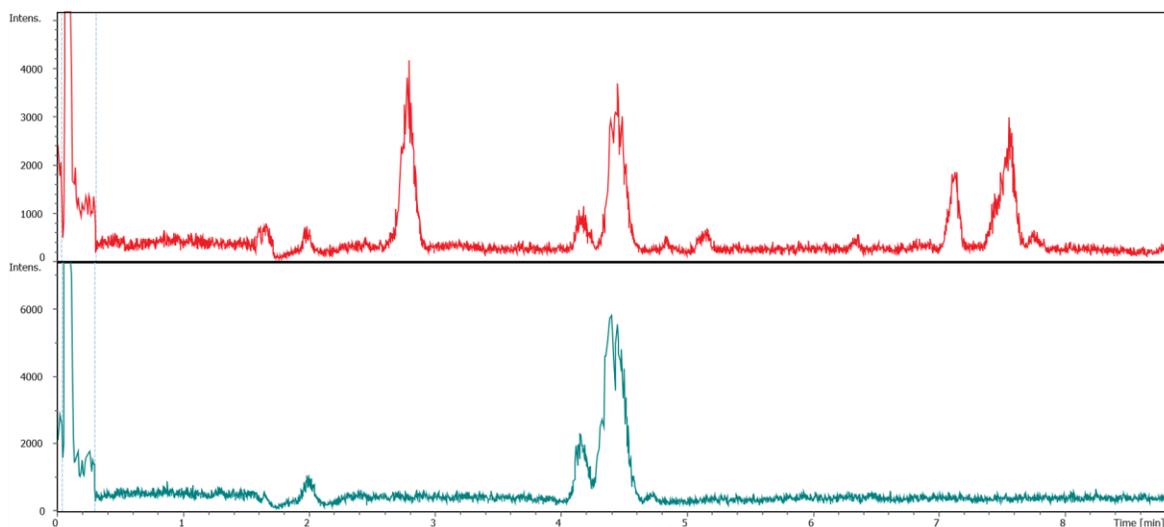


Figura 34 TIC de la mezcla del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> junto con sus impurezas del producto crudo (rojo) y del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> (verde).

Se analizaron los espectros de masas obtenidos para el pico correspondiente al tetramero en la mezcla. El pico junto con los espectros se presenta en la Figura 35.

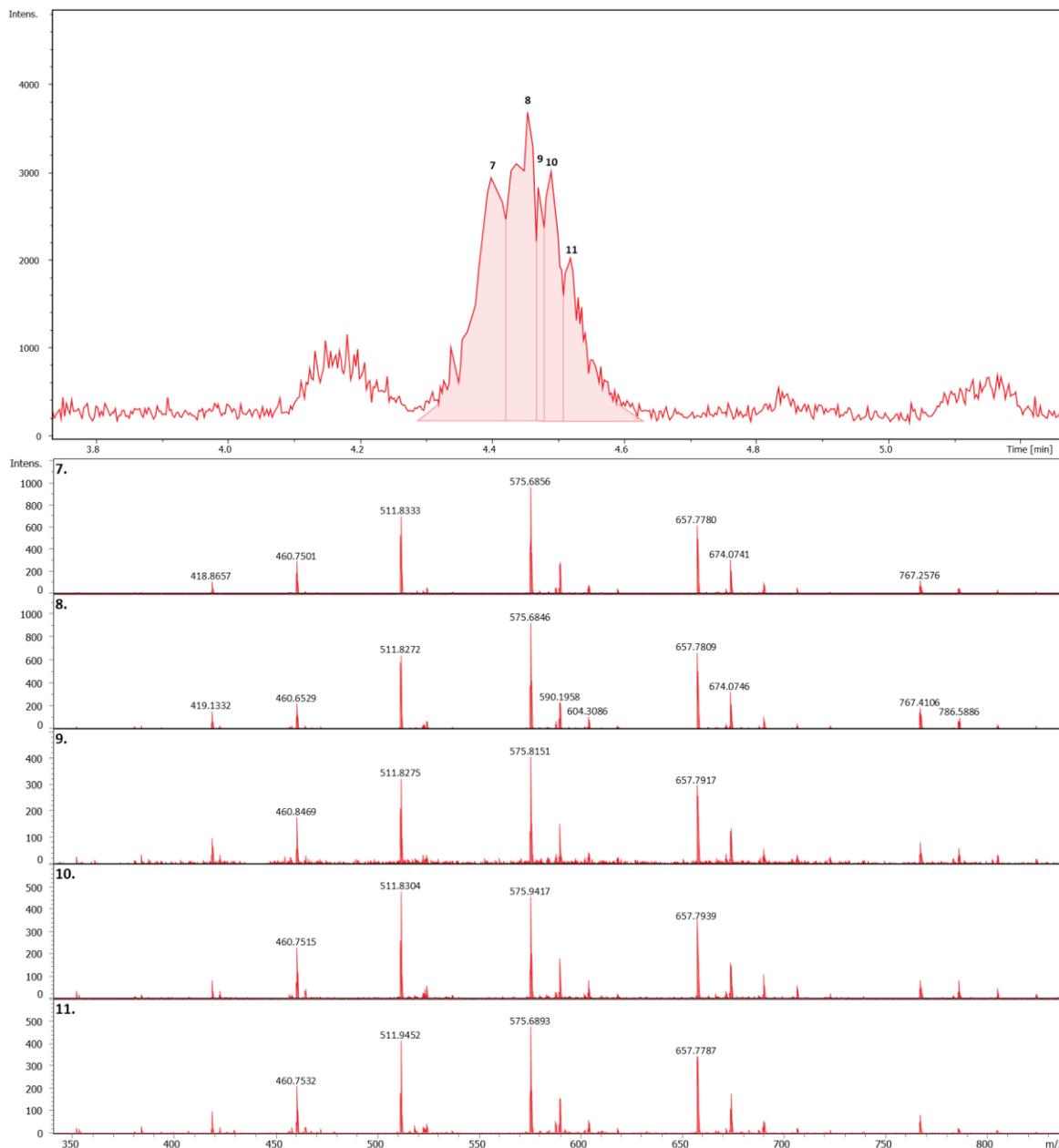


Figura 35 Perfil TIC del pico correspondiente al péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> junto con los espectros de masas analizados en 5 secciones del pico.

Debido a que todos los espectros analizados a través del pico son iguales, se concluye que no hay coelución de otras especies con el pico correspondiente al

tetrámero y se cumple con la selectividad del método. En el análisis por LC-MS no se evidenció coelución posiblemente debido a que el método transferido a UHPLC-MS tenía diferente pendiente al método original usado en HPLC-DAD (pendiente método UHPLC = 1.5, pendiente método HPLC = 5.6).

### 6.6.2 Linealidad - exploratorio

En el estudio exploratorio de la linealidad se encontró que el intervalo lineal es de 0,09 a 2,00 mg/g del péptido. No se alcanzó el punto de saturación con las cantidades empleadas de péptido. Los resultados se presentan en la Figura 36.

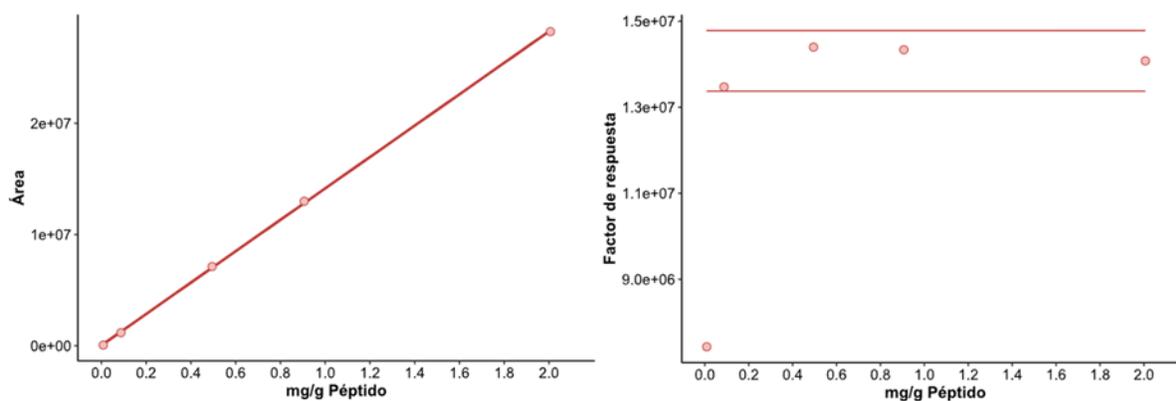


Figura 36 (izquierda) Gráfica de área en función de la concentración del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>; (derecha) gráfica del factor de respuesta en función de la concentración del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, intervalo lineal de 0,09 hasta 2,00 mg/g de péptido.

### 6.6.3 Linealidad

Para la linealidad del análisis del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>, se construyeron 3 curvas de calibración: una a 210 nm (péptido), y dos a 280 nm (péptido y triptófano). La cuantificación se realizó relativo a la señal obtenida para el péptido asumiendo que a 280 nm sólo absorbe el Trp en la molécula. Dos datos de la curva fueron descartados por prueba de Grubbs, los resultados de la prueba se presentan en el ANEXO B.

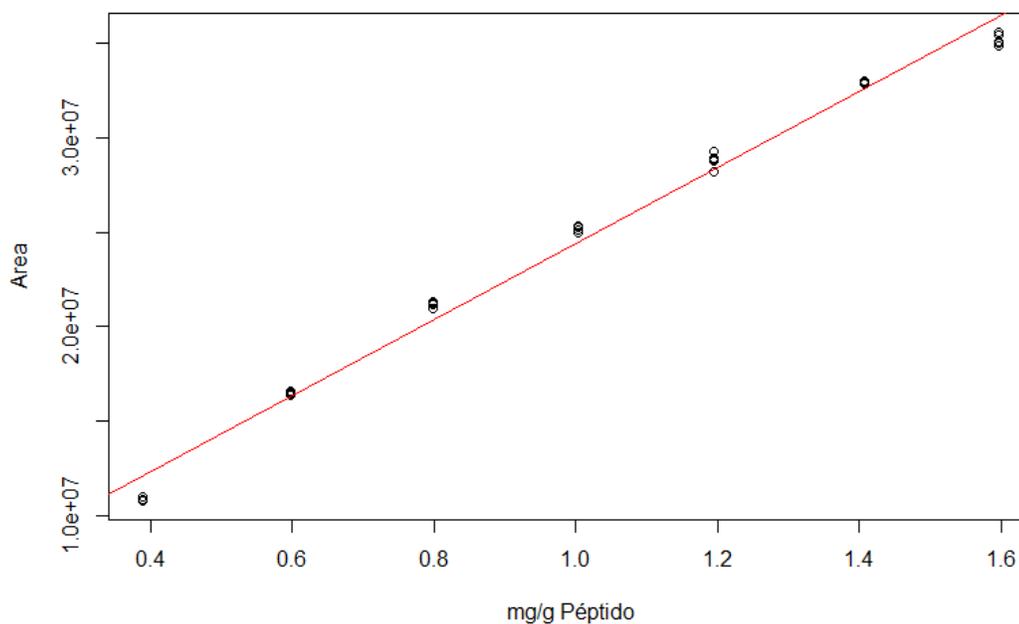


Figura 37 Curva de calibración del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> a 210 nm. Intervalo de trabajo 0.40 – 1.60 mg/g.

En la Figura 37, aunque el comportamiento de los datos parece ser lineal creciente, se aprecia que los puntos no entran en la línea recta (sólo los de 0,60 y 1,40 mg/g tocan la línea); por esto, se aplicó un modelo lineal y un modelo cuadrático a los datos para encontrar el mejor modelo de regresión. Los resultados de la evaluación los dos modelos se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20 Resumen resultados aplicación del modelo lineal y cuadrático para LfcinB (20-25)<sub>4</sub> a 210 nm.

Modelo	B <sub>0</sub> (valor-p)	β <sub>1</sub> (valor-p)	β <sub>2</sub> (valor-p)	Estadístico F	Lack of fit
<b>Lineal</b>					
y = β <sub>0</sub> + β <sub>1</sub> x	4304324 (2,23x10 <sup>-12</sup> )	20103155 (< 2x10 <sup>-16</sup> )	--	< 2,2 x10 <sup>-16</sup>	< 2,2 x10 <sup>-16</sup>
R <sup>2</sup> = 0,9894					
<b>Cuadrático</b>					
y = β <sub>0</sub> + β <sub>1</sub> x + β <sub>2</sub> x <sup>2</sup>	-315114 (0.31)	31201978 (< 2x10 <sup>-16</sup> )	-5577818 (< 2x10 <sup>-16</sup> )	< 2,2 x10 <sup>-16</sup>	0,0007598
R <sup>2</sup> ajustado = 0,9989					

Según los resultados obtenidos, el modelo más adecuado para modelar los datos sería el modelo cuadrático, ya que el  $R^2$  es mayor respecto al modelo lineal, aunque su incremento sea de 0,98 a 0,99. El lack of fit en ninguno de los dos modelos cumple con ser no significativo. Para continuar con el análisis de los modelos de regresión planteados, se construyeron las gráficas de residuales (Figura 38).

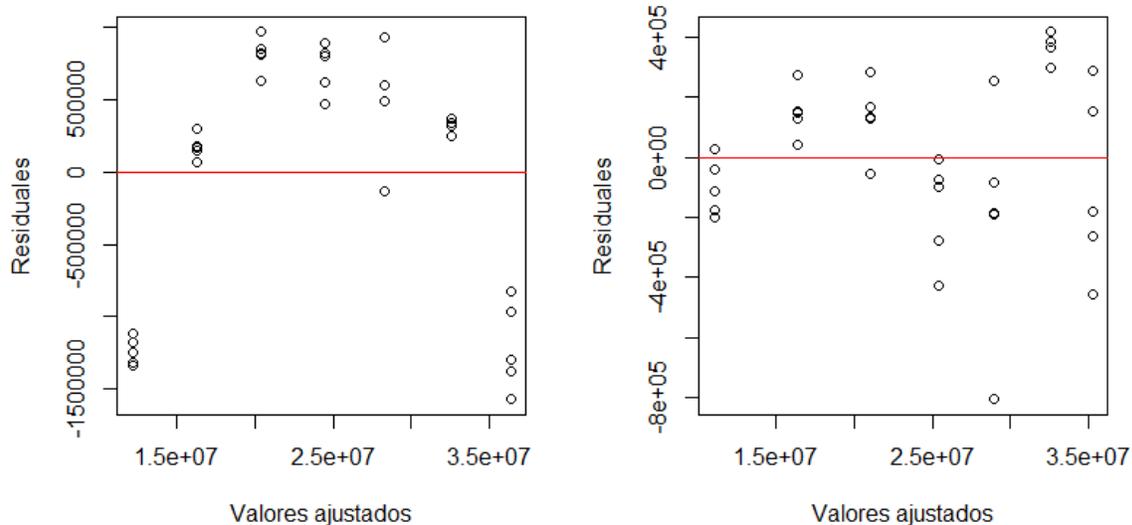


Figura 38 Gráficas de residuales para el ajuste de los datos de la curva de calibración del del tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub> al modelo lineal (izquierda) y cuadrático (derecha).

Para el modelo lineal, los residuales tienen una tendencia similar a una parábola, en consecuencia, no se cumple el supuesto de independencia del error; por otro lado, para el modelo cuadrático los residuales se comportan de forma aleatoria, se cumple entonces el supuesto de independencia del error en el modelo cuadrático, lo que refuerza la hipótesis que el modelo más adecuado para estos datos es el modelo cuadrático.

Adicional, se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de residuales (Tabla 21); los resultados muestran que el modelo que cumple tanto los supuestos de normalidad como de homocedasticidad es el modelo cuadrático a un  $\alpha = 0,05$ .

Tabla 21 Resumen resultados normalidad y homocedasticidad de residuales para los modelos lineal y cuadrático para el ajuste de los datos de la curva de calibración del del tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub>.

Modelo	Normalidad (Shapiro-Wilk)	Homocedasticidad (Bartlett)	Homocedasticidad (Levene)
<b>Lineal</b> $y = \beta_0 + \beta_1 x$	0,0001866	0,003856	0,2015
<b>Cuadrático</b> $y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2$	0,1526	0,003856	0,2015

#### 6.6.4 Análisis relativo al contenido de Trp en el péptido

Teniendo en cuenta que el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> contiene ocho residuos de Trp, se puede cuantificar el contenido del péptido en el lote a partir de una curva de calibración de Trp. Se construyeron dos curvas de calibración, una para el L-Triptófano (L-Trp) y otra para el péptido, (se utilizaron los mismos datos para la curva a 210 nm pero en absorbancia de 280 nm). Las curvas de calibración se presentan en la Figura 39.

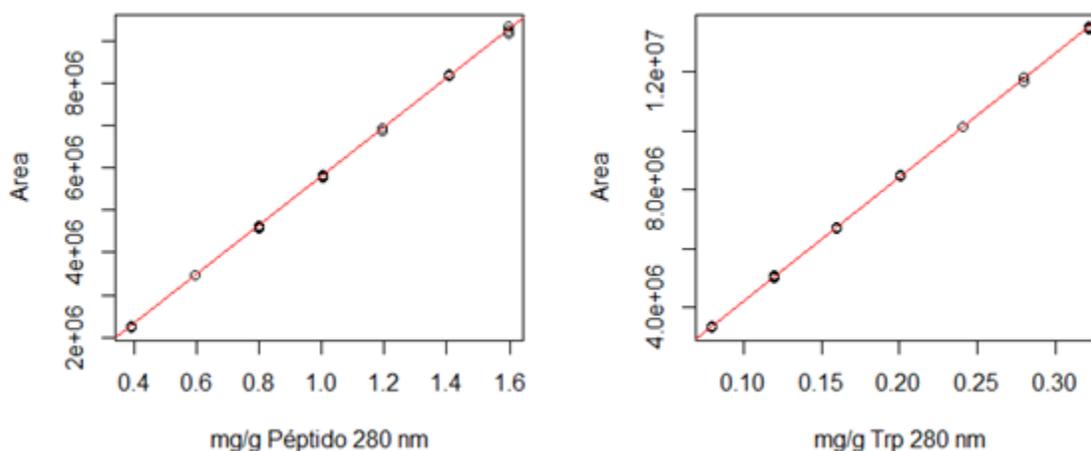


Figura 39 Curvas de calibración para el tetrámero LfcinB (20-25)<sub>4</sub> (izquierda) y el L-Trp (derecha) medidas a 280 nm. Intervalo de trabajo: LfcinB (20-25)<sub>4</sub> 0,40 – 1,60 mg/g; L-Trp 0,08-0,32 mg/g.

A estos resultados se les aplicó tanto modelo lineal como cuadrático pero el modelo cuadrático no fue significativo (ANEXO B)

Tabla 22 Resumen resultados regresión lineal para el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> y el L-Trp a 280 nm.

Compuesto	Intercepto (valor-p)	Pendiente (valor-p)	Estadístico F	Lack of fit
<b>LfcinB (20-25)<sub>4</sub></b>	4454	5785483	< 2,2 x10 <sup>-16</sup>	0,06282
R <sup>2</sup> = 0,9998	(0,769)	(< 2x10 <sup>-16</sup> )		
<b>L-Trp</b>	-7673	42118848	< 2,2 x10 <sup>-16</sup>	0,1352
R <sup>2</sup> = 0,9999	(0,679)	(< 2x10 <sup>-16</sup> )		

De acuerdo con estos resultados en la Tabla 22, se cumple que el intercepto es no significativo (pasa por cero) y la pendiente es significativa (diferente de cero); adicionalmente, el estadístico F y el Lack of fit cumplen con lo requerido.

Se realizó también el análisis de residuales de ambas regresiones lineales, las gráficas se presentan en la Figura 40.

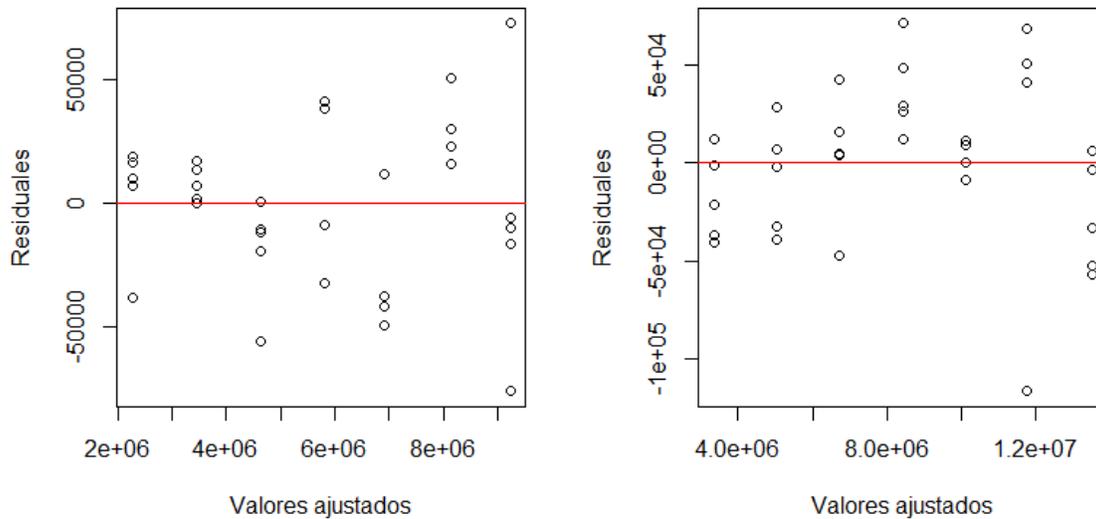


Figura 40 Gráfica de residuales para el péptido (izquierda) y el Trp (derecha) medidos a 280 nm.

Los residuales cumplen con el supuesto de independencia del error al no mostrar tendencias en los resultados. Adicional, cumplen con el supuesto de homocedasticidad según la gráfica. Sin embargo, se realizan las pruebas de Bartlett

y Levene para homocedasticidad junto con la normalidad por Shapiro-Wilk. Los resultados se muestran en la Tabla 23. Se puede concluir por los resultados de las pruebas que se cumplen los supuestos a un  $\alpha = 0,05$ .

Tabla 23 Resumen resultados normalidad y homocedasticidad de residuales para el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> y el L-Trp a 280 nm.

Compuesto	Normalidad (Shapiro-Wilk)	Homocedasticidad (Bartlett)	Homocedasticidad (Levene)
LfcinB (20-25) <sub>4</sub>	0,9731	0,03752	0,6752
L-Trp	0,3102	0,01454	0,6140

### 6.6.5 Cuantificación del péptido usando la curva de calibración de L-Trp

Utilizando la curva de calibración del L-Trp se cuantificó el contenido de péptido. Como ejemplo, se tomaron los puntos de la curva a 280 nm para el péptido. Todos los puntos con cuantificables excepto el punto inferior que sale del intervalo de trabajo en la curva del L-Trp.

Se interpoló el contenido de Trp en el péptido y posteriormente se calculó el contenido de péptido en la muestra. Se presenta una muestra de cálculo de la cuantificación.

$$0,139 \frac{\text{mg Trp}}{\text{g solución}} \times \frac{1 \text{ mmol Trp}}{204,23 \text{ mg Trp}} \times \frac{1 \text{ mmol Péptido}}{8 \text{ mmol Trp}} \times \frac{4594,4960 \text{ mg Péptido}}{1 \text{ mmol Péptido}} \\ \times \frac{100\%}{1,003 \text{ mg/g Péptido}} = 39,0\% \text{ Péptido}$$

Se obtuvo como promedio de todas las mediciones en la curva del péptido de 38,7% con un CV de 0,52%. Se estimó la incertidumbre de esta medición y se obtuvo una

incertidumbre expandida U de 7,9% con un factor de cobertura k de 2. El cálculo de la estimación de la incertidumbre se presenta en el ANEXO D.

### 6.6.6 Precisión (Repetibilidad y precisión intermedia)

La repetibilidad instrumental se evaluó a partir de los resultados del área de la curva de calibración de L-Trp a 280 nm. Los resultados se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24. Resultados repetibilidad instrumental de L-Trp a 280 nm.

Repetición	Nivel mg/g L-Trp		
	Bajo (0,0779 mg/g)	Medio (0,197 mg/g)	Alto (0,315 mg/g)
1	3300368	8457178	13464133
2	3353405	8473784	13487762
3	3303948	8470988	13527379
4	3339550	8516094	13468116
5	3320074	8493522	13517378
<b>Promedio</b>	3323469	8482313	13492954
<b>SD</b>	22809	22911	28531
<b>CV (%)</b>	0,69	0,27	0,21

En estos resultados de repetibilidad instrumental, se obtuvo el mayor CV en el nivel bajo de concentración de L-Trp con un 0,69%, sin embargo, es un valor inferior a 1% al igual que los obtenidos para los niveles medio y alto, se puede concluir que se cumple con el criterio de repetibilidad instrumental.

Para la evaluación de la precisión del método, se realizaron 4 medidas del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> pesando aproximadamente 1,00 mg y disolviéndolo en 1000 µL de agua, el factor de respuesta fue calculado para las longitudes de onda 210 y 280 nm. Los resultados se resumen en la Tabla 25.

Tabla 25 Resultados precisión del método de medición del péptido tetramérico LfcinB (20-25)<sup>4</sup>.

<b>Repetición</b>	<b>FR 210nm D1</b>	<b>FR 280nm D1</b>	<b>FR 210nm D2</b>	<b>FR 280nm D2</b>
1	25251583	5649426	22211723	4820248
2	22279041	4930957	20926470	4394715
3	20827825	4436042	22683167	4863745
4	21294741	4598310	23185874	4973863
<b>Promedio</b>	22413297	4903684	22251809	4763143
<b>SD</b>	1986520	538150	968965	253984
<b>CV (%)</b>	<b>8,86</b>	<b>10,97</b>	<b>4,35</b>	<b>5,33</b>

Los resultados obtenidos muestran resultados de CV comprendidos entre 4,35% y 10,97%. De forma general, los resultados para 280 nm presentan valores de CV más altos que los resultados para 210 nm. Aunque los resultados parecen tener problemas de precisión por el alto CV, es un comportamiento normal debido a la pequeña cantidad de péptido que se pesa por análisis, entre más pequeña la muestra, más alto el CV. Adicionalmente, la homogeneidad de la muestra también es más notoria al trabajar a estas pequeñas cantidades de masa, es posible tomar una parte de la muestra que posea diferente pureza que otra porción del sólido analizado.

Según la AOAC (75), el valor aceptable para 1,0 mg/g (1000 ppm) es de 3,7% de CV. Ninguno de los resultados cumple con este criterio debido a la pequeña cantidad de muestra utilizada. Utilizar más cantidad de muestra podría disminuir el CV pero haría el análisis más costoso.

Para la visualización de datos, se presenta el boxplot de los resultados en la Figura 41, donde se observa que los factores de respuesta se encuentran distribuidos en la misma magnitud entre días.

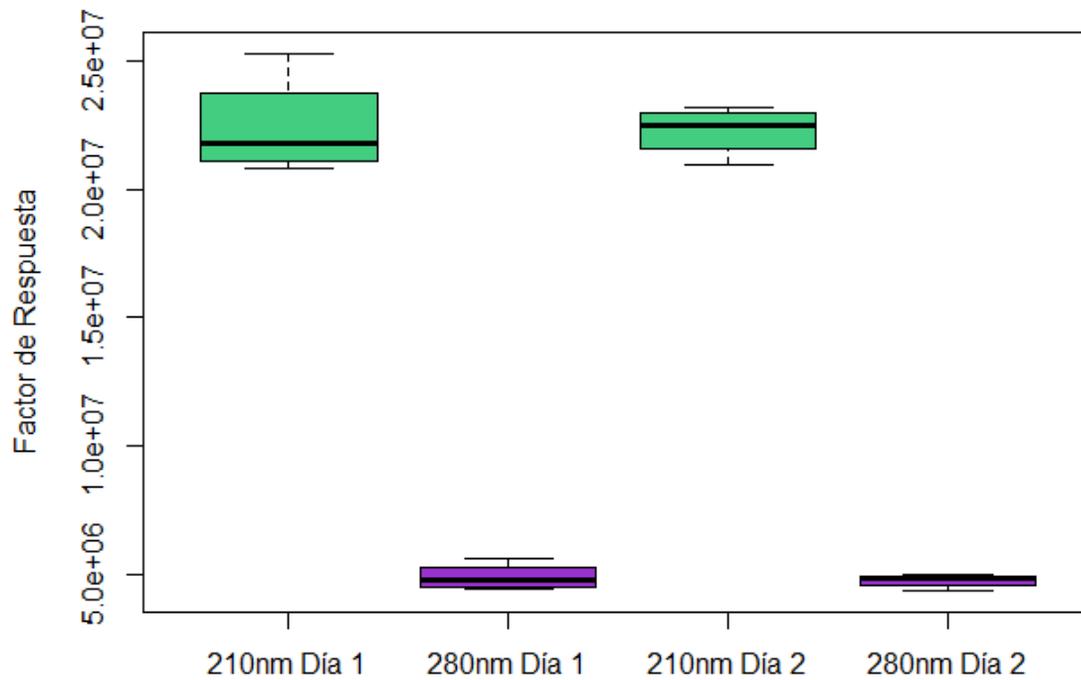


Figura 41 Boxplot del estudio de precisión para el péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>.

Por último, se realizó la prueba de Bartlett para la homogeneidad de varianzas entre días para cada longitud de onda, donde se encontró que el valor-p para 210 nm fue de 0,2684 y para 280 nm fue de 0,2486; a un  $\alpha=0,05$  se rechaza  $H_0$  y se concluye que las varianzas de los factores de respuesta entre días son homogéneas para cada longitud de onda medida.

### 6.6.7 Robustez

De Forma similar a como se realizó para el análisis de TFA, se evaluó la robustez por la metodología de superficies de respuesta aplicando un modelo cuadrático.

Los factores y niveles evaluados fueron:

- Longitud de onda (nm): 205 (-1), 210 (0), 215 (+1)
- % TFA en la fase móvil: 0,025 (-1), 0,050 (0), 0,075 (+1)
- Flujo (mL/min): 1,80 (-1), 2,00 (0), 2,20 (+1)

Los resultados del modelo cuadrático aplicado se muestran en la Tabla 26 y las superficies de respuesta obtenida para cada par de interacciones se presenta en la Figura 42.

Tabla 26 Resultados del valor estimado de cada factor e interacción para el modelo cuadrático para el estudio de robustez del método de análisis del péptido LfcinB (20-25)<sup>4</sup>.

	Estimado	Valor-p
<b>(intercepto)</b>	13824558	< 2.2x10 <sup>-16</sup>
<b>Longitud de onda</b>	-415723	0.001368
<b>% TFA</b>	-1266379	7.05x10 <sup>-11</sup>
<b>Flujo</b>	-340221	0.006785
<b>Longitud de onda:% TFA</b>	360748	0.017005
<b>Longitud de onda:Flujo</b>	345690	0.021589
<b>%TFA:Flujo</b>	12034	<b>0.932532*</b>
<b>Longitud de onda<sup>2</sup></b>	370482	0.050190
<b>% TFA<sup>2</sup></b>	45723	0.801288
<b>Flujo<sup>2</sup></b>	1256461	3.13x10 <sup>-7</sup>

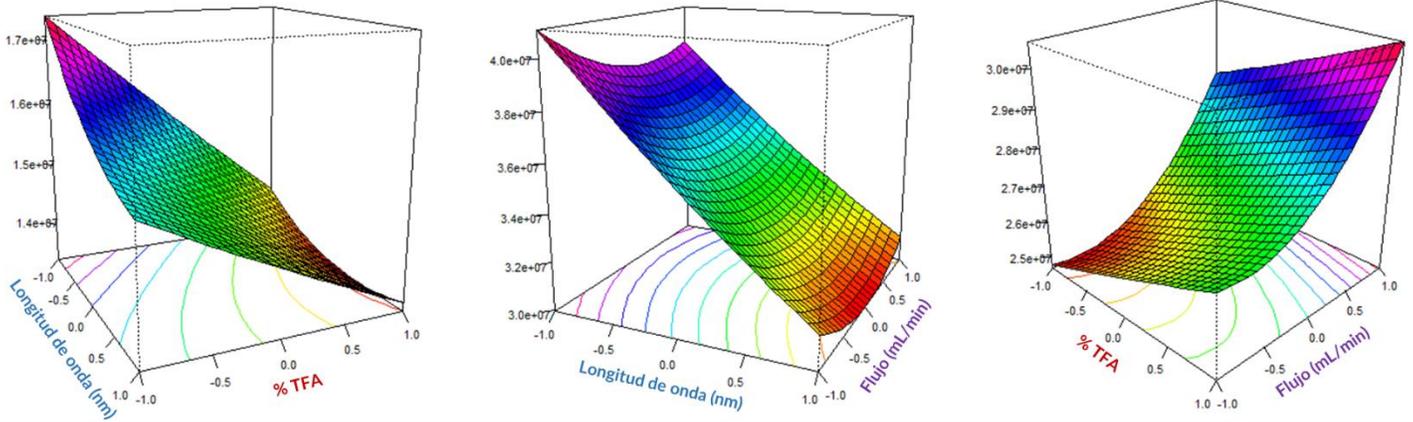


Figura 42 Superficies de respuesta de las interacciones de los factores Longitud de onda, % TFA y Flujo en el estudio de robustez del método de análisis del péptido LfcinB (20-25)<sup>4</sup>.

Superficies de respuesta de las interacciones de los factores Longitud de onda, % TFA y Flujo en el estudio de robustez del método de análisis del péptido LfcinB (20-25)<sup>4</sup>.

El valor-p en cada caso indica si este factor es significativo o no para el modelo de regresión, en caso de no serlo indica que el factor o la interacción de dos factores es robusta, ya que no está afectando en la variabilidad de la señal. Para este caso, todos los factores individuales son significativos, es decir son no robustos; respecto a las interacciones, “% TFA:Flujo” es no significativa a un  $\alpha = 0,05$ , es decir, esta interacción es robusta. Las demás interacciones serían no robustas a un  $\alpha = 0,05$  pero a un  $\alpha = 0,01$  serían robustos. Para corroborar la robustez de las interacciones, se analizan las superficies de respuesta (Figura 42) dónde el punto central (0,0) tiene que estar vecino al punto estacionario de la gráfica (un máximo o un mínimo). Ninguna de las gráficas muestra claramente el punto estacionario, lo que indica que posiblemente estas interacciones sean no robustas bajo las condiciones experimentales en las cuales se realizó el estudio de robustez

## Conclusiones

Se desarrolló una metodología de análisis de péptidos sintéticos por RP-HPLC donde se emplearon tres tipos de columnas (empacada, monolítica y Core-Shell). Estas columnas fueron caracterizadas por gráficas de van Deemter y Kinetic Plots, la columna monolítica tuvo el mejor desempeño para el análisis de una molécula de bajo peso molecular y una molécula peptídica, esto bajo condiciones de elución isocrática. En el análisis por gradiente de una mezcla de péptidos sintéticos, la columna monolítica fue más eficiente que la columna empacada, al mostrar mejor separación del par crítico seleccionado y mostrar picos más altos y angostos. Esta metodología de análisis fue satisfactoriamente transferida y optimizada a columnas Core-Shell a partir de la ecuación del  $k^*$  para el análisis de péptidos sintéticos por UHPLC-ESI-MS. Las columnas Core-Shell tuvieron más eficiencia que la columna monolítica al mostrar mayor número de especies que no fueron observables en la monolítica. Esta metodología desarrollada para la columna monolítica se aplicó para la validación de la cuantificación del contenido del péptido en el lote.

Empleando la estrategia SPPS-Fmoc/tBu fue posible obtener el lote de 124 mg de péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> con pureza superior al 95%.

Fue posible la caracterización del péptido tetramérico LfcinB (20-25)<sub>4</sub> diferenciado de su dímero precursor empleando las técnicas de RMN (1D-2D) y espectrometría de masas de baja y alta resolución (ESI-Q, ESI-QTOF, MALDI-TOF)

Se logró cuantificar el contenido de agua por Karl Fischer, el contenido de TFA por HPLC-DAD y el contenido del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> en el lote, cada una de estas metodologías de análisis fue validada siguiendo los lineamientos establecidos por

la USP. El contenido de cada uno de estos analitos expresado como porcentaje en peso fue: agua (Karl Fischer) =  $0,101 \pm 0,013$  %, TFA (HPLC-DAD) =  $25,7 \pm 6,2$  %, péptido (RP-HPLC-DAD) =  $38,7 \pm 7,9$  %.

De las metodologías validadas en esta investigación se resaltan los siguientes resultados más relevantes por cada metodología:

Contenido de agua - Karl Fischer:

- Selectividad: La metodología fue selectiva respecto al blanco de metanol a un  $\alpha = 0,05$  usando una solución de 10 mg/mL del péptido disuelto en metanol.
- Linealidad: El intervalo de trabajo fue 230,1 – 976,9  $\mu\text{g H}_2\text{O}$ , la curva cumplió con los supuestos de normalidad e independencia del error.
- Veracidad-Precisión: se obtuvo la mejor veracidad y precisión al nivel de “1% Medio”, correspondiente a 544 mg de agua adicionados.
- Robustez: la técnica fue robusta para el factor “Agitación” junto con las interacciones de Agitación:Tiempo y Agitación:Gotas.

Contenido de TFA residual – HPLC-DAD:

- Selectividad: La metodología fue selectiva para TFA respecto a una molécula de estructura similar (ácido acético) y los otros analitos de la matriz (péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>).
- Linealidad: El modelo que se ajustó a los datos experimentales fue el modelo cuadrático, cumpliendo con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia del error. El intervalo de trabajo fue de 0,10-0,70 mg/g de solución de TFA.
- Precisión: Se obtuvo la mejor precisión del método para la solución de TFA. Los péptidos crudo y puro mostraron CV entre 7,8% y 16,4%.

- Veracidad: Se cumplió con la veracidad a los 3 niveles de concentración evaluados con un % de recuperación cercano al 100%.
- Robustez: La metodología fue robusta para el factor “fuerza iónica” y la interacción “fuerza iónica:longitud de onda” según la metodología aplicada de superficies de respuesta.

Contenido del péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub> – RP-HPLC-DAD:

- Selectividad: la metodología fue selectiva por DAD con una pureza de pico de 0,90 y por LC-MS al no mostrar coelución de otras especies según los espectros analizados en el pico.
- Linealidad: La curva de calibración de Trp para la cuantificación del péptido a 280 nm se ajustó a un modelo lineal según los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia del error. El intervalo de trabajo de la curva fue 0,08-0,32 mg/g de solución de Trp.
- Precisión: se obtuvieron CV entre 5,3 y 11,0 % para el método de preparación del péptido medido a 280 nm
- Robustez: Los factores evaluados (Longitud de onda, % TFA en fase móvil, Flujo) se consideraron críticas para este método según la metodología de superficies de respuesta.

Las metodologías implementadas, desarrolladas y validadas en esta tesis son de vital importancia para el cumplimiento de la fase cero de los estudios preclínicos y servirán como base para la caracterización de otros péptidos promisorios como agentes terapéuticos.

## Bibliografía

1. WHO. World Health Organization - Cancer [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;0(0):1–41.
3. Huertas N de J, Monroy ZJR, Medina RF, Castañeda JEG. Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRQWQWRMKKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Molecules.* 2017;22(6).
4. Huertas Méndez NDJ, Vargas Casanova Y, Gómez Chimbi AK, Hernández E, Leal Castro AL, Melo Diaz JM, et al. Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules.* 2017;22(3):1–10.
5. León-Calvijo MA, Leal-Castro AL, Almanzar-Reina GA, Rosas-Pérez JE, García-Castañeda JE, Rivera-Monroy ZJ. Antibacterial activity of synthetic peptides derived from lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1DUMMY.
6. Vargas Casanova Y, Rodríguez Guerra JA, Umaña Pérez YA, Leal Castro AL, Almanzar Reina G, García Castañeda JE, et al. Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules.* 2017;22(10):1–11.

7. United THE, Pharmacopeia S. 2018 USP 41. Vol. 5. 2018.
8. Janvier S, Sutter E De, Wynendaele E, Spiegeleer B De, Vanhee C, Deconinck E. Talanta Analysis of illegal peptide drugs via HILIC-DAD-MS. *Talanta* [Internet]. 2017;174(June):562–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.034>
9. Mutalik S, Hewavitharana AK, Shaw PN, Anissimov YG, Roberts MS, Parekh HS. Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for quantification of peptide dendrimers in human skin permeation experiments. 2009;877:3556–62.
10. Anaya K, Sus N, Gadelha C, Frank J. Development and validation of a rapid reversed - phase liquid chromatography method for CnAMP1 peptide quantification in human intestinal cell lines. *Amino Acids* [Internet]. 2019;51(3):407–18. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2675-7>
11. Egusquiaguirre SP, Manguán-garcía C, Perona R, Luís J, Maria R, Igartua M. Development and validation of a rapid HPLC method for the quantification of GSE4 peptide in biodegradable PEI – PLGA nanoparticles. *J Chromatogr B* [Internet]. 2014;972:95–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.09.041>
12. Instituto Nacional del Cáncer. Cáncer de seno (mama) [Internet]. 2019. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>
13. Salvatierra-González R, Benguigui Y. Resistencia antimicrobiana en las Américas: Magnitud del problema y su contención. *Organ Panam la Salud, Of Sanit Panam Of Reg la Organ Mund la Salud*. 2000;
14. Castañeda-casimiro J, Ortega-roque JA, Marcela A, Aquino-andrade A, Serafín-lópez J, Estrada-parra S, et al. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, asma e Inmunol* [Internet]. 2009;18(1):16–29.

- Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2009/al091d.pdf>
15. Barragán-Cárdenas A, Insuasty-Cepeda DS, Niño-Ramírez VA, Umaña-Pérez A, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, et al. The Nonapeptide RWQWRWQWR: A Promising Molecule for Breast Cancer Therapy. *ChemistrySelect*. 2020;5(31):9691–700.
  16. Barragán-Cárdenas A, Urrea-Pelayo M, Niño-Ramírez VA, Umaña-Pérez A, Vernot JP, Parra-Giraldo CM, et al. Selective cytotoxic effect against the MDA-MB-468 breast cancer cell line of the antibacterial palindromic peptide derived from bovine lactoferricin. *RSC Adv*. 2020;10(30):17593–601.
  17. Guerra JR, Cárdenas AB, Ochoa-Zarzosa A, Meza JL, Umaña Pérez A, Fierro-Medina R, et al. The tetrameric peptide LfcinB (20-25)<sub>4</sub> derived from bovine lactoferricin induces apoptosis in the MCF-7 breast cancer cell line. *RSC Adv*. 2019;9(36):20497–504.
  18. Kunda NK. Antimicrobial peptides as novel therapeutics for non-small cell lung cancer. *Drug Discov Today* [Internet]. 2020;25(1):238–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.11.012>
  19. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(22):2588–98.
  20. Bruni N, Capucchio MT, Biasibetti E, Pessione E, Cirrincione S, Giraud L, et al. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules*. 2016;21(6).
  21. Schibli DJ, Hwang PM, Vogel HJ. The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles. *FEBS Lett*. 1999;446(2–3):213–7.
  22. Insuasty-Cepeda DS, Barragán-Cárdenas AC, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza

- JE, Fierro-Medina R, García-Castañeda JE, et al. Peptides derived from (RRWQWRMKKLG)<sub>2</sub>-K-Ahx induce selective cellular death in breast cancer cell lines through apoptotic pathway. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):1–13.
23. Andersson L, Blomberg L, Flegel M, Lepsa L, Nilsson B, Verlander M. Large-scale synthesis of peptides. *Biopolym - Pept Sci Sect.* 2000;55(3):227–50.
24. Zompra AA, Galanis AS, Werbitzky O, Albericio F. Manufacturing peptides as active pharmaceutical ingredients. *Future Med Chem.* 2009;1(2):361–77.
25. Ardila-Chantré N, Hernández-Cardona AK, Pineda-Castañeda HM, Estupiñan-Torres SM, Leal-Castro AL, Fierro-Medina R, et al. Short peptides conjugated to non-peptidic motifs exhibit antibacterial activity. *RSC Adv.* 2020;10(49):29580–6.
26. Insuasty Cepeda D, Pineda Castañeda H, Rodríguez Mayor A, García Castañeda J, Maldonado Villamil M, Fierro Medina R, et al. Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Extraction with Gradient Elution: A Simple, Economical, Fast, and Efficient Methodology. *Molecules* [Internet]. 2019;24(7):1215. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/7/1215>
27. FDA-U.S. Department of Health and Human Services. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. *Guid Ind.* 2015;(July):1–15.
28. Aguirre, L E al. *Validación de Métodos Analíticos.* Barcelona: AEFI; 2001.
29. AOAC. How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification. *ALACC Guid.* 2007;
30. ICH-Harmonised-tripartite-guideline. *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, Q2 (R1),* Geneva. *Int Conf Harmon.* 2005;1994(October 1994):1–17.
31. Magnusson B, Örnemark U. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related*

- Topics. 2nd ed. Eurachem. 2014. 62 p.
32. ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions. In 1994.
  33. JCGM 200:2012 International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM). 2012. 91 p.
  34. The Global Cancer Observatory [Internet]. World Health Organization. 2018. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>
  35. Terrasse V. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018 [Internet]. 2018. Available from: [https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf)
  36. Organization WH. Globocan Colombia Fact Sheet. 2018;1–2. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-factsheets.pdf>
  37. Bustamante Rojas C. Fases del desarrollo de un nuevo medicamento. 2013;1–4. Available from: [http://clinicalevidence.pbworks.com/w/file/attach/63221078/FASES DE DESARROLL%0AO.pdf](http://clinicalevidence.pbworks.com/w/file/attach/63221078/FASES_DE_DESARROLL%0AO.pdf)
  38. Atkinson A. Principles of Clinical Pharmacology. Second Edi. 2007. 501–505 p.
  39. Roux S, Zékri E, Rousseau B, Cintrat JC, Fay N. Elimination and exchange of trifluoroacetate counter-ion from cationic peptides: A critical evaluation of different approaches. *J Pept Sci*. 2008;14(3):354–9.
  40. Thermo. Application Note 115 Determination of Trifluoroacetic Acid ( TFA ) in Peptides. :1–6.
  41. Wujcik CE, Cahill TM, Seiber JN. Extraction and Analysis of Trifluoroacetic Acid in Environmental Waters. *Anal Chem*. 1998;70(19):4074–80.
  42. Cahill TM, Benesch JA, Gustin MS, Zimmerman EJ, Seiber JN. Simplified

- method for trace analysis of trifluoroacetic acid in plant, soil and water samples using headspace gas chromatography. *ACS Div Environ Chem Prepr.* 1999;39(2):15–7.
43. Johnson M, Liu M, Struble E, Hettiarachchi K. Characterization of cyclic peptides containing disulfide bonds. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2015;109:112–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.009>
  44. Anthis NJ, Clore GM. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *Protein Sci.* 2013;22(6):851–8.
  45. Moffatt F, Senkans P, Ricketts D. Approaches towards the quantitative analysis of peptides and proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the absence of a pure reference sample. *J Chromatogr A.* 2000;891(2):235–42.
  46. McNaught A, Wilkinson A. IUPAC the Gold Book [Internet]. 2019. p. 1. Available from: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/I03089>
  47. Vanhee C, Janvier S, Desmedt B, Moens G, Deconinck E, Beer O De, et al. Talanta Analysis of illegal peptide biopharmaceuticals frequently encountered by controlling agencies. *Talanta* [Internet]. 2015;142:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.022>
  48. Stahl M. Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology. *Agil Technol* [Internet]. 2003;8:5988–8647. Available from: <http://www.agilent.com/cs/library/applications/5988-8647EN.pdf> (Accessed on 24 April 2016)
  49. FDA. Methods, Method Verification and Validation. *ORA Lab Proced.* 2014;II:1–19.
  50. Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm*

- Biomed Anal. 2001;24(5–6):723–53.
51. Myers R, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 4th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2016. 825 p.
  52. Müller A, Flottmann D, Schulz W, Seitz W, Weber WH. Assessment of robustness for an LC-MS-MS multi-method by response-surface methodology, and its sensitivity. *Anal Bioanal Chem.* 2008;390(5):1317–26.
  53. Li W, Zhao LC, Wang Z, Zheng YN, Liang J, Wang H. Response surface methodology to optimize enzymatic preparation of deapio-platycodin D and platycodin D from radix platycodi. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4089–100.
  54. Sarabia LA, Ortiz MC. Response Surface Methodology. *Comprehensive Chemometrics.* 2009;345–90.
  55. Agrawal R, Belemkar S, Bonde C. A Stepwise Strategy Employing Automated Screening for Reversed-Phase Chromatographic Separation of Itraconazole and Its Impurities. *Chromatographia* [Internet]. 2019;82(12):1767–75. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03802-0>
  56. Dolan JW. System Suitability. *LCGC North Am.* 2009;27(12):1040–4.
  57. van Deemter JJ, Klinkenberg A, Zuiderweg FJ. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem Eng Sci.* 1956;5(6):271–89.
  58. Gritti F, Guiochon G. The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2013;1302:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.032>
  59. Hawkes SJ. Modernization of the van Deemter equation for chromatographic zone dispersion. 1983;60(May):393–8.
  60. DeStefano JJ, Schuster SA, Lawhorn JM, Kirkland JJ. Performance

- characteristics of new superficially porous particles. *J Chromatogr A* [Internet]. 2012;1258:76–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.036>
61. González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2015;64:17–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.008>
62. Fekete S, Ganzler K, Fekete J. Efficiency of the new sub-2 $\mu$ m core-shell (Kinetex™) column in practice, applied for small and large molecule separation. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;54(3):482–90.
63. Desmet G, Clicq D, Gzil P. Geometry-independent plate height representation methods for the direct comparison of the kinetic performance of LC supports with a different size or morphology. *Anal Chem*. 2005;77(13):4058–70.
64. Desmet G, Clicq D, Nguyen DTT, Guillarme D, Rudaz S, Veuthey JL, et al. Practical constraints in the kinetic plot representation of chromatographic performance data: Theory and application to experimental data. *Anal Chem*. 2006;78(7):2150–62.
65. Broeckhoven K, Cabooter D, Desmet G. Kinetic performance comparison of fully and superficially porous particles with sizes ranging between 2.7  $\mu$ m and 5  $\mu$ m: Intrinsic evaluation and application to a pharmaceutical test compound. *J Pharm Anal* [Internet]. 2013;3(5):313–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2012.12.006>
66. Broeckhoven K, Cabooter D, Eeltink S, Desmet G. Kinetic plot based comparison of the efficiency and peak capacity of high-performance liquid chromatography columns: Theoretical background and selected examples. *J*

- Chromatogr A [Internet]. 2012;1228:20–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.003>
67. Broeckhoven K, Cabooter D, Lynen F, Sandra P, Desmet G. The kinetic plot method applied to gradient chromatography: Theoretical framework and experimental validation. *J Chromatogr A* [Internet]. 2010;1217(17):2787–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.023>
68. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. 960 p.
69. Snyder LR, Dolan JW. *High-performance gradient elution: the practical application of the linear-solvent-strength model*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007. 496 p.
70. Meyer VR. *Practical High Performance Liquid Chromatography*. 5th ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2010. 432 p.
71. Aguilar M. HPLC of Peptides and Proteins [Internet]. Vol. 251, *Methods in Molecular Biology*. 2004. 3–8 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704444>
72. Dolan JW. Method Adjustment for Gradient Elution. *LCGC North America*. 2017;480–5.
73. Yang Y. Peptide Global Deprotection/Scavenger-Induced Side Reactions. *Side Reactions in Peptide Synthesis*. 2016. 43–75 p.
74. Mohammad M, Motalib A, Afrina A, Salahuddin KM, Mashud SM, Sharif A. Method Validation for the Determination of Water Content of Metered Dose Inhaler By Karl Fischer Coulometer. *Int Res J Pharm*. 2012;3(7):144–7.
75. AOAC. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *J AOAC Int Off Method Anal*. 2016;9.
76. Daniel C. Use of Half-Normal Plots in Interpreting Factorial Two-Level Experiments. *Technometrics*. 1959;1(4):311.

## Anexos

### Anexo A. Resultados complementarios al contenido de agua por Karl Fischer.

#### Selectividad:

Prueba Q de Dixon para descartar un dato atípico en el contenido de agua del péptido LfcinB (20-25)<sup>4</sup>.

ppm agua en péptido
2811.24
1605.62
1478.49
1634.56

Dixon test for outliers

$Q = 0.8829$ ,  $p\text{-value} = 0.02233$

alternative hypothesis: highest value 2811.24 is an outlier

comparado con un  $\alpha = 0.05$ , el dato 2811.24 es un dato atípico

#### Linealidad:

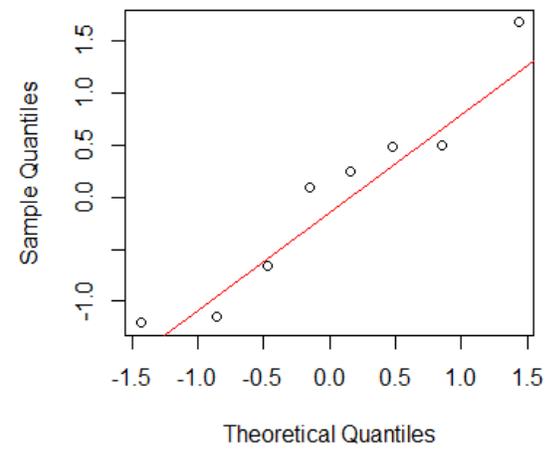
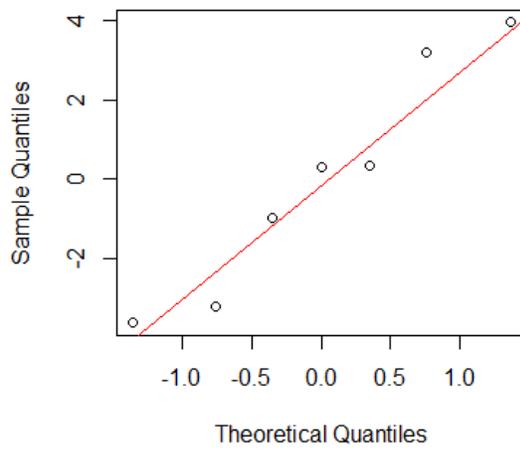
Tabla mediciones linealidad bajas cantidades de agua con % de sesgo

$\mu\text{g}$ Agua adicionados	$\mu\text{g}$ Agua medidos	% de sesgo
-----------------------------------	-------------------------------	------------

---

14,7392	18,09	22,7
27,0062	32,06	18,7
39,8748	46,29	16,1
52,4426	59,34	13,1
66,646	75,43	13,2
79,618	90,73	13,9
86,5928	101	16,6
93,1164	106,99	14,9

---



Gráfica Q-Q de residuales de residuales de curvas a altas cantidades (izquierda) y bajas cantidades (derecha) de agua.

**Robustez:**

Arreglo factorial  $2^3$  para la evaluación de la robustez del método de Karl Fischer para el contenido de agua en el péptido.

<b>Gotas</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Agitación</b>
<b>-1</b>	<b>-1</b>	<b>-1</b>
<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>-1</b>
<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>
<b>-1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>
<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

## Anexo B. Resultados complementarios a la cuantificación del péptido por HPLC-DAD

### Linealidad:

Prueba Grubbs para descartar un dato atípico en la curva de Trp a 280 nm.

Trp 280 nivel 5	Trp 280 nivel 5
10127453	11653578
10147463	11820978
10135672	11838900
10144694	11810865
<b>10078595</b>	<b>10094633</b>

Grubbs test for one outlier

$G = 1.716897$ ,  $U = 0.078833$ ,  $p\text{-value} = 0.02407$

alternative hypothesis: lowest value 10078595 is an outlier

Grubbs test for one outlier

$G = 1.7802377$ ,  $U = 0.0096105$ ,  $p\text{-value} = 0.001003$

alternative hypothesis: lowest value 10094633 is an outlier

comparado con un  $\alpha = 0.05$ , los datos 10078595 y 10094633 es un dato atípico

Aplicación de un modelo cuadrático a la curva del péptido y el Trp a 280 nm

Péptido LfcinB (20-25)<sub>4</sub>

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-78993	-17478	2178	15693	69574

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	16920	37116	0.456	0.652
con96ox280nm	5755498	82676	69.615	<2e-16 ***
xx2	15033	40820	0.368	0.715

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 33510 on 30 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9998, Adjusted R-squared: 0.9998

F-statistic: 8.123e+04 on 2 and 30 DF, p-value: < 2.2e-16

Triptófano (Trp)

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-117672	-15012	-1861	28120	67650

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	-108208	41385	-2.615	0.0138 *
conTrp280nm	43317710	457844	94.612	<2e-16 ***
xxt2	-2986627	1123467	-2.658	0.0125 *

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

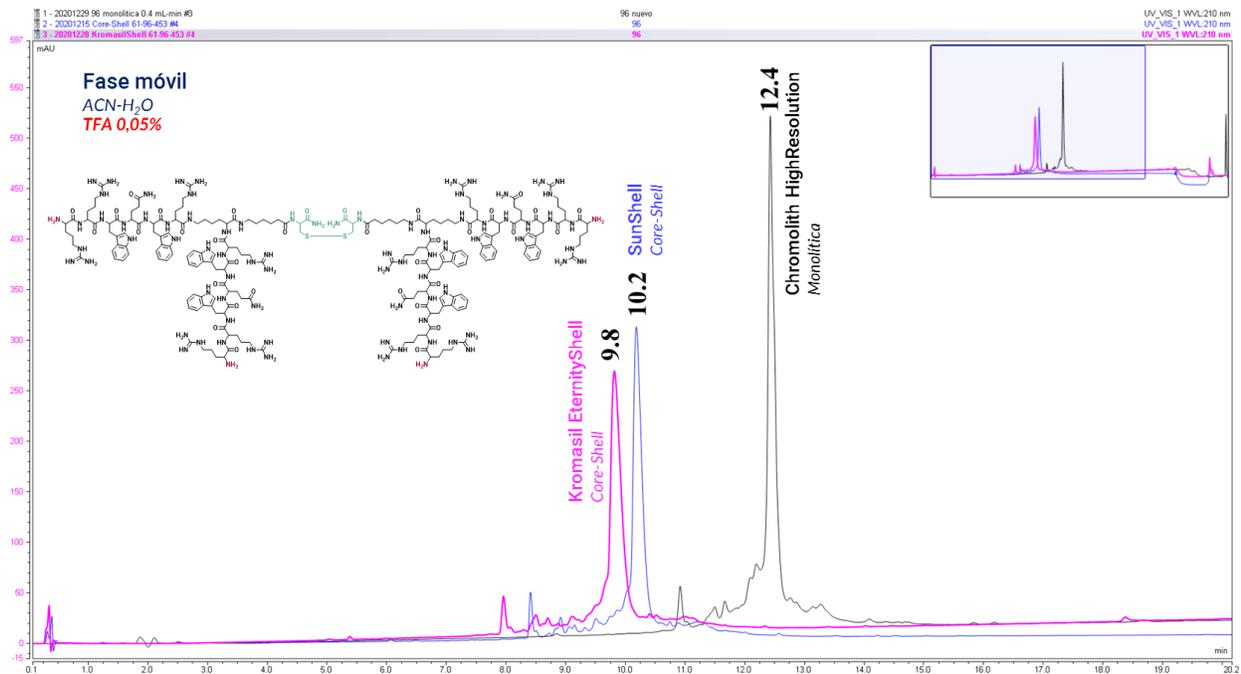
Residual standard error: 36890 on 30 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9999, Adjusted R-squared: 0.9999

F-statistic: 1.42e+05 on 2 and 30 DF, p-value: < 2.2e-16

Para el péptido, el término cuadrático es no significativo, para el Trp, es significativo a un  $\alpha = 0.05$ , pero se opta por el modelo más sencillo, debido a que el término no es altamente significativo (valor-p muy pequeño)

**Figura 1.** Análisis del péptido LfcinB (20-25)4 por UHPLC-DAD en el equipo Thermo Dionex UltiMate 3000. Flujo: 0,40 mL/min,  $\lambda=210$  nm, fase móvil: Agua-TFA 0,05%:ACN-TFA 0,05% (solvente B), Elución por gradiente 5/5/50/100/100/5/5 %B en 0/1/20.9/21/24/24.1/27 minutos. Inyección: 5,0  $\mu$ L



## Anexo C. System Suitability

Para la determinación del System Suitability, se tomaron como parámetros de control el  $t_R$  y el área, de 5 medidas para el TFA y 4 medidas para el péptido se establecieron los intervalos min y max y se fijó como CV menor al 2%

TFA

Muestra QC: Solución TFA 0,15 mg/g

Medidas previas

Repetición	$t_R$ (min)	Área
1	2,487	2414707
2	2,480	2414965
3	2,520	2429805
4	2,507	2427498
5	2,540	2403646
<b>Promedio</b>	2,507	2418124
<b>Min</b>	2,557	2466487
<b>Max</b>	2,457	2369762
<b>CV (%)</b>	0,97	0,44

Medidas de control de calidad (QC) durante el análisis de las muestras. Lin: linealidad; Rep-Sel: Repetibilidad y Selectividad; PI: Precisión intermedia; Ver: Veracidad.

Muestra	$t_R$ (min)	Area	¿Cumple?
Lin QC-1	2,487	2420322	Sí
Lin QC-2	2,487	2415698	Sí
Lin QC-3	2,487	2408213	Sí
Lin QC-4	2,487	2413293	Sí

<b>Lin QC-5</b>	2,487	2442544	Sí
<b>CV (%)</b>	0	0,55	
<b>Rep-Sel QC-1</b>	2,500	2414766	Sí
<b>Rep-Sel QC-2</b>	2,513	2404239	Sí
<b>Rep-Sel QC-3</b>	2,533	2402350	Sí
<b>Rep-Sel QC-4</b>	2,540	2402161	Sí
<b>Rep-Sel QC-5</b>	2,540	2398802	Sí
<b>CV (%)</b>	0,70	0,25	
<b>PI QC-1</b>	2,520	2452654	Sí
<b>PI QC-2</b>	2,513	2432144	Sí
<b>PI QC-3</b>	2,520	2433439	Sí
<b>CV (%)</b>	0,16	0,47	
<b>Ver QC-1</b>	2,487	2407469	Sí
<b>Ver QC-2</b>	2,487	2447154	Sí
<b>Ver QC-3</b>	2,513	2427579	Sí
<b>Ver QC-4</b>	2,513	2426128	Sí
<b>CV (%)</b>	0,60	0,67	

Péptido y Trp

Muestra QC: Solución Cafeína 0,25 mg/g

Medidas previas

<b>Repetición</b>	<b>t<sub>R</sub> (min) 280 nm</b>	<b>Área 280 nm</b>	<b>t<sub>R</sub> (min) 210 nm</b>	<b>Área 210 nm</b>
<b>1</b>	2,927	9930341	2,927	24505379
<b>2</b>	3,000	9923856	3,000	24691983
<b>3</b>	2,967	9896482	2,973	24405204
<b>4</b>	2,933	9915589	2,933	24382540

<b>Promedio</b>	2,957	9916567	2,958	24496277
<b>min</b>	2,868	9619070	2,870	23761388
<b>max</b>	3,045	10214064	3,047	25231165
<b>CV</b>	1,14	0,15	1,17	0,58

Medidas de control de calidad (QC) durante el análisis de las muestras. Lin: linealidad;

Rep-Sel: Repetibilidad y Selectividad; PI: Precisión intermedia; Caf: Cafeína.

<b>Muestra</b>	<b>t<sub>R</sub> (min) 280 nm</b>	<b>Area 280 nm</b>	<b>t<sub>R</sub> (min) 210 nm</b>	<b>Area 210 nm</b>	<b>¿Cumple?</b>
<b>Lin Caf QC-1</b>	2,993	9986040	2,993	24970778	Sí
<b>Lin Caf QC-2</b>	3,007	9939368	3,007	24728309	Sí
<b>Lin Caf QC-3</b>	3,067	9912818	3,067	24299075	Sí
<b>Lin Caf QC-4</b>	3,027	9920003	3,027	24571995	Sí
<b>Lin Caf QC-5</b>	3,007	9857067	3,007	24416365	Sí
<b>CV</b>	0,95	0,47	0,95	1,07	
<b>Rep-Sel Caf QC-1</b>	3,020	9887279	3,020	24554439	Sí
<b>Rep-Sel Caf QC-2</b>	2,933	9941856	2,940	24433607	Sí
<b>Rep-Sel Caf QC-3</b>	3,000	9923393	3,000	23996379	Sí
<b>CV</b>	1,53	0,28	1,39	1,21	
<b>PI Caf QC-1</b>	2,940	9857581	2,940	23983642	Sí
<b>PI Caf QC-2</b>	2,993	9942648	2,933	24551053	Sí
<b>CV</b>	1,26	0,61	0,17	1,65	

## Anexo D. Estimación de la incertidumbre

### Estimación de la incertidumbre para la medición del contenido de agua por Karl Fischer

La medición del contenido de agua en las muestras para la determinación de la incertidumbre se hizo a partir de la regresión lineal. El contenido de agua se interpoló a partir de los  $\mu\text{g}$  de agua medidos por el equipo.

Los aportes a la incertidumbre considerados para esta medición fueron los siguientes

1. Incertidumbre de la masa: obtenida a partir del certificado de calibración de la balanza Mettler Toledo XPE 204.
2. Incertidumbre por interpolación en regresión lineal: obtenida de la ecuación:

$$S_{x0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad [1-D]$$

Donde

$S_{y/x}$  = Error típico  $y/x$

$b$  = intercepto

$m$  = número de lecturas de la muestra

$n$  = número de mediciones en la curva de calibración (o grados de libertad)

$y_0$  = valor de la respuesta para la muestra medida

$x_i$  = medida de cada valor de  $x$  de la curva de calibración

$\bar{x}$ ;  $\bar{y}$  = promedio de las medidas de  $x$  y  $y$  en la curva de calibración

3. Incertidumbre por repetibilidad: Calculada como

$$u_{rep} = \frac{s}{\sqrt{n_{rep}}} \quad [2-D]$$

Donde:

$s$  = desviación estándar de las medidas de la muestra

$n_{rep}$  = número de réplicas

4. Incertidumbre por resta de masas y resta de concentraciones: Calculada como incertidumbre combinada:

$$u_{resta} = \sqrt{(u_{x1})^2 + (u_{x2})^2} \quad [3-D]$$

Donde  $u_{x1}$  y  $u_{x2}$  son las incertidumbres de dos medidas de masa o concentración.

El modelo matemático para calcular el porcentaje de agua fue:

$$\% p/p KF = \frac{m_{H_2O} \times 100}{m_{muestra}}$$

La incertidumbre combinada de este modelo se calcula como:

$$u_c^2(\% p/p KF) = \left( \frac{\partial \% p/p KF}{m_{H_2O}} \times u(m_{H_2O}) \right)^2 + \left( \frac{\partial \% p/p KF}{m_{muestra}} \times u(m_{muestra}) \right)^2$$

$$u_c^2(\% p/p KF) = \left( \frac{100}{m_{muestra}} \times u(m_{H_2O}) \right)^2 + \left( -\frac{m_{H_2O} \times 100}{m_{muestra}^2} \times u(m_{muestra}) \right)^2$$

La incertidumbre combinada para el promedio de los porcentajes se calculó con la raíz de la suma al cuadrado de las incertidumbres para cada porcentaje (ecuación [3-D]).

Los porcentajes de agua y la incertidumbre combinada para las medidas de blancos y muestra fueron:

- Blancos:  $0,057 \pm 0,014$
- Muestra:  $0,157 \pm 0,009$

El contenido de agua se determinó por la resta de estos porcentajes, por lo tanto, se calculó la incertidumbre combinada con la raíz de la suma al cuadrado de las incertidumbres.

La incertidumbre final se reportó como incertidumbre expandida con un factor de cobertura  $k=2$ , para obtener como resultado final:

$$\% p/p H_2O \text{ LfcinB (20-25)}_4 = 0,100 \pm 0,013 \% (k = 2)$$

### Incertidumbre de la cuantificación del TFA:

La medida del contenido de TFA en el péptido se determinó por interpolación cuadrática. Los aportes a la incertidumbre fueron los siguientes:

1. Incertidumbre de la masa: obtenida a partir del certificado de calibración de la balanza Adam EAB 125i
2. Incertidumbre por repetibilidad: Calculada con la ecuación [2-D]
3. Incertidumbre por interpolación en regresión cuadrática:

El modelo matemático para interpolar en una regresión cuadrática es

$$x = \frac{-\hat{b} \pm \sqrt{\hat{b}^2 - 4\hat{a}(\hat{c} - y)}}{2\hat{a}}$$

Las derivadas parciales de este modelo matemático son:

$$\frac{\partial x}{\partial y} = \frac{1}{\sqrt{\hat{b}^2 - 4\hat{a}(\hat{c} - y)}}$$

$$\frac{\partial x}{\partial \hat{a}} = \frac{-\hat{c} + y}{\hat{a}\sqrt{\hat{b}^2 - 4\hat{a}(\hat{c} - y)}} - \frac{-\hat{b} + \sqrt{\hat{b}^2 - 4\hat{a}(\hat{c} - y)}}{2\hat{a}}$$

$$\frac{\partial x}{\partial \hat{b}} = \frac{-1 + \frac{\hat{b}}{\sqrt{\hat{b}^2 - 4\hat{a}(\hat{c} - y)}}}{2\hat{a}}$$

$$\frac{\partial x}{\partial \hat{c}} = \frac{-1}{\sqrt{\hat{b}^2 - 4\hat{a}(\hat{c} - y)}}$$

La incertidumbre combinada es expresada como:

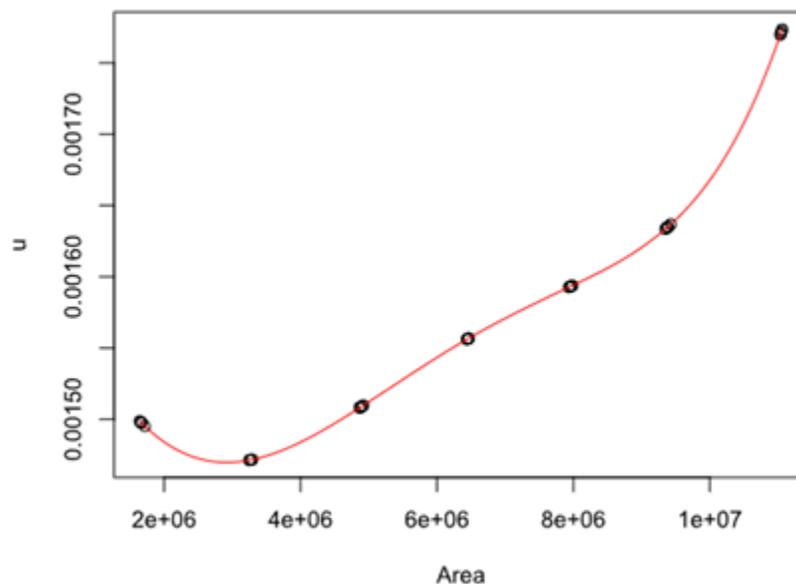
$$u^2 = \left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)^2 (s_y)^2 + \left(\frac{\partial x}{\partial \hat{a}}\right)^2 (s_{\hat{a}})^2 + \left(\frac{\partial x}{\partial \hat{b}}\right)^2 (s_{\hat{b}})^2 + \left(\frac{\partial x}{\partial \hat{c}}\right)^2 (s_{\hat{c}})^2$$

Donde  $s_y$ ,  $s_a$ ,  $s_b$ ,  $s_c$  es el error de cada parámetro.

También debe considerarse la covarianza entre los coeficientes a, b y c. La incertidumbre es recalculada como:

$$u^2 = u^2 + \left(\frac{\partial x}{\partial \hat{a}}\right) \left(\frac{\partial x}{\partial \hat{b}}\right) s_{ab} + \left(\frac{\partial x}{\partial \hat{a}}\right) \left(\frac{\partial x}{\partial \hat{c}}\right) s_{ac} + \left(\frac{\partial x}{\partial \hat{b}}\right) \left(\frac{\partial x}{\partial \hat{c}}\right) s_{bc}$$

En la gráfica se representa la incertidumbre en función de y (área).



Dado que las áreas de las muestras se encontraban dentro del segundo y tercer nivel, se interpoló con una regresión lineal en este intervalo para obtener las incertidumbres de las medidas.

El modelo matemático para calcular el % de TFA en el péptido es:

$$\% p/p TFA = \frac{m_{SLN} \times C_{TFA \text{ int}} \times 100}{m_{péptido}}$$

Donde m son las masas para la solución y el péptido y  $C_{TFA \text{ int}}$  es la concentración de TFA interpolada para la muestra.

Después de aplicar la derivada parcial del modelo, la incertidumbre combinada se calcula como

$u_c(\% \text{ p/p TFA})$

$$= \left( \frac{C_{TFA \text{ int}} \times 100}{m_{\text{péptido}}} \times u(m_{SLN}) \right)^2 + \left( \frac{m_{SLN} \times 100}{m_{\text{péptido}}} \times u(C_{TFA \text{ int}}) \right)^2$$

$$+ \left( - \frac{m_{SLN} \times C_{TFA \text{ int}} \times 100}{(m_{\text{péptido}})^2} \times u(m_{\text{péptido}}) \right)^2$$

Las incertidumbres por cada determinación estuvieron alrededor del 1%, la incertidumbre de las 10 determinaciones y la incertidumbre de la repetibilidad (ecuación[2-D]) se combinaron para obtener la incertidumbre combinada de la medición. El resultado con la incertidumbre expandida con un factor de cobertura k de 2 fue:

$$\% \text{ p/p TFA LfcinB (20-25)}_4 = 25,7 \pm 6,2 \% (k = 2)$$

## Incertidumbre de la cuantificación del contenido del péptido en el lote

La medida del contenido de TFA en el péptido se determinó por interpolación cuadrática. Los aportes a la incertidumbre fueron los siguientes:

1. Incertidumbre de la masa: obtenida a partir del certificado de calibración de la balanza Adam EAB 125i
2. Incertidumbre por repetibilidad: Calculada con la ecuación [2-D]
3. Incertidumbre por interpolación en regresión lineal (ecuación [1-D])
4. Incertidumbre por suma de pesos (ecuación [3-D])

El modelo matemático para calcular el % de péptido en el lote es:

$$\% \text{ p/p LfcinB } (20 - 25)_4 = \frac{C_{Trp \text{ int}} \times PM_{Pept} \times 100}{PM_{Trp} \times C_{SLN \text{ Pept}} \times 8}$$

Donde  $C_{Trp \text{ int}}$  es la concentración del Trp interpolado de la muestra del péptido,  $C_{SLN \text{ Pept}}$  es la concentración de la solución de péptido a partir de la masa pesada del péptido,  $PM_{Pept}$  y  $PM_{Trp}$  son los pesos moleculares del péptido y el Trp.

Después de aplicar la derivada parcial del modelo, la incertidumbre combinada se calcula como

$$\begin{aligned} u_c(\% \text{ p/p LfcinB } (20 - 25)_4) &= \left( \frac{PM_{Pept} \times 100}{PM_{Trp} \times C_{SLN \text{ Pept}} \times 8} \times u(C_{Trp \text{ int}}) \right)^2 \\ &+ \left( \frac{C_{Trp \text{ int}} \times 100}{PM_{Trp} \times C_{SLN \text{ Pept}} \times 8} \times u(PM_{Pept}) \right)^2 \\ &+ \left( -\frac{C_{Trp \text{ int}} \times PM_{Pept} \times 100}{(PM_{Trp})^2 \times C_{SLN \text{ Pept}} \times 8} \times u(PM_{Trp}) \right)^2 \\ &+ \left( -\frac{C_{Trp \text{ int}} \times PM_{Pept} \times 100}{PM_{Trp} \times (C_{SLN \text{ Pept}})^2 \times 8} \times u(C_{SLN \text{ Pept}}) \right)^2 \end{aligned}$$

La incertidumbre de los pesos moleculares se determinó con las incertidumbres de los pesos atómicos reportados por la IUPAC.

Las incertidumbres para cada medición se encontraron alrededor de 3,3%. Combinando la incertidumbre de cada determinación con la incertidumbre por repetibilidad se obtuvo la incertidumbre final para la medición reportada como incertidumbre expandida con un factor de cobertura  $k = 2$  como:

$$\% \text{ p/p LfcinB (20-25)}_4 = 38,7 \pm 7,9 \% (k = 2)$$