

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE  
HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)  
PARA MEDIR COENZIMA Q10 EN PLAQUETAS.**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**MYRIAN IBETH CHILUIZA JÁCOME**

**SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE DEL 2012**

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Srta. Myrian Ibeth Chiluiza Jácome

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA**

---

Ing. Tatiana Páez

**SECRETARIO ACADÉMICO**

---

Ab. Carlos Orozco

Sangolquí, Septiembre del 2012

# CERTIFICACIÓN

Dr. Marcelo Grijalva Silva.

Ing. Pedro Romero Saker.

## **Certifican:**

Que el trabajo titulado “**Estandarización y Validación de un protocolo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para medir Coenzima Q10 en plaquetas**”, realizado por la Srta. Myrian Ibeth Chiluita Jácome, como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas establecidas por la Escuela Politécnica del Ejército, en el reglamento.

Debido a la relevancia científica expuesta en el presente trabajo de tesis, recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Myrian Ibeth Chiluita Jácome que lo entregue a la Ing. Tatiana Páez, en su calidad de Directora de la Carrera.

Sangolquí, Septiembre del 2012.

---

**Dr. Marcelo Grijalva Silva**

DIRECTOR

---

**Ing. Pedro Romero Saker**

CODIRECTOR

# DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Myrian Ibeth Chiluita Jácome

## Declaro que:

El proyecto de grado denominado “**Estandarización y Validación de un protocolo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para medir Coenzima Q10 en plaquetas**”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Septiembre del 2012.

---

Myrian Ibeth Chiluita Jácome

# AUTORIZACIÓN

Yo, Myrian Ibeth Chiluitza Jácome

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“Estandarización y Validación de un protocolo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para medir Coenzima Q10 en plaquetas”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Septiembre del 2012.

---

Myrian Ibeth Chiluitza Jácome

## **DEDICATORIA**

A mis padres, con todo mi amor, por haberme dado todo lo que puede haber anhelado en la vida. Ustedes son mi luz, mi paz, mi alegría. Les entrego este proyecto, que es mi mayor esfuerzo y espero sea solo el inicio de muchos otros dignos del esmero con el que me han educado.

**Myrian Ibeth Chiliza Jácome**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, porque en los momentos más difíciles, Él me ha demostrado que todo es posible.

A mis padres, Gerardo y Lucky, por el infinito amor y abnegación, con los que me han cuidado toda mi vida.

A mis hermanas, Paquita y Pauli, por su cariño, desvelos y las largas horas de viaje realizadas apoyándome en mis proyectos.

Al personal del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, especialmente, al Dr. José Rivera Buse y a la Lcda. Marcia Racines Orbe, por la confianza y el apoyo incondicional depositados en este proyecto.

Al Dr. Marcelo Grijalva y al Ing. Pedro Romero Saker, por la gran predisposición y objetividad con la que suplieron todas mis dudas y abordaron la revisión de este documento.

Al Ing. Jaime Gia, por su valiosa contribución en el análisis estadístico de la validación del presente método analítico.

**Myrian Ibeth Chiluita Jácome**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN .....	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD .....	iv
AUTORIZACIÓN .....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	viii
LISTADO DE TABLAS .....	x
LISTADO DE FIGURAS .....	x
ABREVIATURAS .....	xi
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1    Formulación del problema.....	1
1.2    Justificación del problema.....	2
1.3    Objetivos de la investigación.....	5
1.3.1    Objetivo General.....	5
1.3.2    Objetivos Específicos.....	5
1.4    Hipótesis.....	5
1.5    Marco Teórico.....	5
1.5.1    Coenzima Q10.....	5
1.5.2    Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).....	14
1.5.3    Validación de métodos analíticos.....	19
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1    Participantes.....	27
2.2    Zona de estudio.....	27
2.3    Período de investigación.....	27
2.4    Diseño y Análisis de datos.....	27
2.5    Criterios de inclusión de muestras.....	28
2.6    Criterios de exclusión de muestras.....	28
2.7    Procedimientos.....	29
2.7.1    Estandarización del método.....	29



2.7.2	Validación del método.....	31
2.7.3	Muestras.....	37
CAPÍTULO 3. RESULTADOS .....		39
3.1	Principales parámetros modificados del protocolo de referencia.....	39
3.1.1	Composición de la fase móvil.....	39
3.1.2	Velocidad de flujo.....	41
3.2	Protocolo óptimo estandarizado.....	44
3.3	Parámetros de desempeño del método.....	45
3.3.1	Exactitud.....	45
3.3.2	Precisión.....	47
3.3.3	Robustez.....	50
3.3.4	Sensibilidad del método: límite de detección y cuantificación.....	51
3.3.5	Linealidad.....	53
3.3.6	Confirmación de identidad: selectividad/especificidad.....	55
3.3.7	Incertidumbre.....	57
3.4	Muestras.....	58
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....		68
4.1	Estandarización del método.....	68
4.2	Validación del método.....	69
4.3	Muestras.....	72
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....		73
CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES.....		75
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....		76

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1: Disposición de las muestras para determinar los parámetros de precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad). .....	32
Tabla 3.1: Respuesta cromatográfica del estándar 2uM de CoQ10 a las tres fases móviles de prueba.....	39
Tabla 3.2: Respuesta cromatográfica del estándar 2uM de CoQ10 a las tres velocidades de flujo de prueba. ....	42
Tabla 3.3: Comprobación de veracidad del método (exactitud). ....	46
Tabla 3.4: Determinación del criterio de repetibilidad. ....	47
Tabla 3.5: Determinación del criterio de reproducibilidad. ....	48
Tabla 3.6: Prueba F para igualdad de varianzas (criterio de repetibilidad). ....	49
Tabla 3.7: Prueba F para igualdad de varianzas (criterio de reproducibilidad).....	49
Tabla 3.8: Rangos de aceptación del método.....	50
Tabla 3.9: Concentración de los blancos de muestra. ....	51
Tabla 3.10: Límite de detección y límite de cuantificación del método.....	52
Tabla 3.11: Comportamiento de estándares preparados al límite de detección y cuantificación del método. ....	52
Tabla 3.12: Curvas de calibración del método.....	53
Tabla 3.13: Límites de aceptación de las curvas de calibración del método. ....	55
Tabla 3.14: Desviaciones estándares de las fuentes aleatorias de incertidumbre del método (Evaluación Tipo A). ....	57
Tabla 3.15: Desviaciones estándares de las fuentes sistemáticas de incertidumbre del método (Evaluación Tipo B). ....	58
Tabla 3.16: Respuesta de las 35 muestras corridas con el método validado.....	59

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Síntesis de la coenzima Q10 .....	6
Figura 1.2: Coenzima Q10 en metabolismo mitocondrial.....	8
Figura 2.1: Fuentes de incertidumbre del método actual. ....	36
Figura 2.2: Clasificación de las fuentes de incertidumbre del método actual. ....	37
Figura 3.1: Áreas obtenidas del estándar de CoQ10 2uM según las fases móviles probadas. ....	40
Figura 3.2: Tiempo de retención del estándar de CoQ10 2uM según las fases móviles probadas.....	40
Figura 3.3: Altura del pico cromatográfico del estándar de CoQ10 2uM según las fases móviles probadas.....	41
Figura 3.4: Áreas obtenidas del estándar de CoQ10 2uM según las velocidades de flujo probadas. ....	42
Figura 3.5: Tiempo de retención del estándar de CoQ10 2uM según las velocidades de flujo probadas. ....	43
Figura 3.6: Altura del pico cromatográfico del estándar de CoQ10 2uM según las velocidades de flujo probadas. ....	43
Figura 3.7: Respuesta cromatográfica de las curvas de calibración del método.....	54
Figura 3.8: Cromatograma de la inyección de metanol grado HPLC. ....	56
Figura 3.9: Cromatograma de la inyección de 1-propanol grado HPLC.....	56
Figura 3.10: Cromatograma de la inyección de la fase móvil del método (metanol 60%: 1-propanol 40%).....	57
Figura 3.11: Relación entre la edad y la concentración de CoQ10 en plaquetas. ....	63
Figura 3.12: Relación entre el género y la concentración de CoQ10 en plaquetas.....	64
Figura 3.13: Relación entre el número de plaquetas y la concentración de CoQ10 en plaquetas.....	64
Figura 3.14: Carta de control del desempeño del método validado. ....	66

## ABREVIATURAS

CoQ10, CoQ, Q10: Coenzima Q10.

ATP: Adenosín tri fostato.

CoQH<sub>2</sub>: Ubiquinol.

EROS: Especies reactivas de oxígeno.

FAD: flavín adenín dinucleótido (forma oxidada).

FADH: flavín adenín dinucleótido (forma reducida).

LDL: lipoproteínas de baja densidad.

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada).

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida).

NADP<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada).

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

LC: Límite de cuantificación.

LD: Límite de detección.

LIC: límite inferior de control.

LSC: Límite superior de control.

EPA: Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos.

FDA: Agencia de administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos.

ICH: Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano.

INEC: Instituto nacional de estadísticas y censos.

INEN: Instituto ecuatoriano de normalización.

ISO: Organización internacional de estandarización.

IUPAC: Unión internacional de química pura y aplicada.

USP: Farmacopea de los Estados Unidos.

## RESUMEN

La coenzima Q10 es un antioxidante soluble en grasa fundamental para el funcionamiento óptimo de todas las células del organismo. Actualmente, se recomienda su utilización como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades mitocondriales, cardíacas e hipertensión, por lo que, es necesario establecer métodos de análisis que midan objetivamente las concentraciones de esta coenzima en los tejidos de interés médico.

El objetivo de la presente tesis es estandarizar y validar un protocolo de medición de coenzima Q10 en plaquetas mediante la metodología de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución); para el efecto se realizaron varias pruebas tales como variación de la composición de la fase móvil, variación de la velocidad de flujo, variación del volumen de inyección de las muestras, a fin de optimizar los parámetros del método. Además, se efectuaron pruebas de exactitud, precisión, robustez, linealidad, sensibilidad, identidad e incertidumbre, para determinar los parámetros de calidad del mismo.

La estandarización y validación del protocolo de medición de coenzima Q10 en plaquetas por HPLC, cumplió con las normas internacionales más reconocidas en la reglamentación de métodos analíticos tales como las dadas por el Eurachem, la ICH (Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano) y la USP (Farmacopea de los Estados Unidos).

## **ABSTRACT**

The coenzyme Q10 is a liposoluble antioxidant essential for optimal functioning of all cells in the body. Currently, its use is recommended as an adjunct in the treatment of mitochondrial, hypertensive and heart diseases, so, is necessary to establish analytical methods to objectively measure concentrations of this coenzyme in tissues of medical interest.

The objective of this thesis is to standardize and validate a measurement protocol of coenzyme Q10 in platelets by the methodology of HPLC (high performance liquid chromatography), so, several tests such as composition mobile phase variation, flow rate variation, sample injection volume variation, were performed to optimize parameters of the method. Other tests were ran out, including those of accuracy, precision, robustness, linearity, sensitivity, identity and uncertainty, to determine quality parameters of method.

The standardization and validation of the measurement protocol coenzyme Q10 in platelets by HPLC met international standards for analytical methods such as those by the Eurachem, ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) and USP (United States Pharmacopeia).

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del problema.

La coenzima Q10 (CoQ10), es un antioxidante soluble en grasa que se encuentra en prácticamente todas las membranas celulares, de ahí su nombre alternativo *ubiquinona*. Todo el metabolismo y las principales funciones celulares del organismo dependen de la actividad antioxidante de la vitamina E (principal defensa oxidativa del organismo humano), sin embargo, ésta obedece a la disponibilidad de la CoQ10 para realizar su función; así como para su reciclaje. Solo con la cantidad suficiente de coenzima Q10, la vitamina E pasa sobre el electrón no apareado (radical libre) y lo elimina (Miles M. V., 2007).

Asimismo, la CoQ10 en su forma reducida, actúa en la prevención del daño oxidativo del ADN, membranas biológicas y lipoproteínas, impidiendo los procesos de peroxidación lipídica (Barshop B, 2007) (Crane F. , 2000).

Esta coenzima es un componente esencial de la mitocondria, donde interviene en la formación de un gradiente de protones transmembrana, que constituye la base para captar energía y formar el ATP, además, que, permite el paso de electrones desde el complejo I y II al complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, sin lo cual ésta simplemente se frenaría y consecuentemente todas las células afectadas morirían por asfixia (Brandt U, 1997) (Okun JG, 1999).



Como se puede observar, la CoQ10 es fundamental para el funcionamiento óptimo de todos los tipos celulares, por lo cual no es sorprendente encontrar un número aparentemente extenso de enfermedades que responden favorablemente a su suplementación, tales como enfermedad periodontal, arteriosclerosis, angina de pecho, diversas cardiomiopatías, hipertensión arterial, la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Huntington, entre otras (Beal, 1999) (Munkholm, 1999) (Langsjoen, 1999).

Adicionalmente, varios estudios han demostrado que la deficiencia de Q10 puede estar involucrada con el incremento del riesgo a contraer patologías asociadas sobre todo con desórdenes metabólicos y cardíacos (Ghirlanda G., 1993) (Folkers K., 1990). Las posibles causas hasta ahora descritas para dicha deficiencia son: ingesta insuficiente de la coenzima, deterioro de la biosíntesis de la misma (relacionado con la edad), utilización excesiva en el cuerpo, o cualquier combinación de las tres anteriores, siendo la disminución por la ingesta considerada solo en casos de desnutrición crónica y caquexia (Littarru G.P., 1991).

## **1.2 Justificación del problema.**

La coenzima Q10 se mide usualmente en suero o plasma; sin embargo, poco se sabe acerca de si la concentración en el plasma refleja la concentración intracelular, o a su vez, si éstas dos reflejan la concentración en otros lugares del organismo. Mientras que la concentración plasmática de la coenzima Q10 es significativamente influenciada por la absorción dietética (Weber C, 1997), los niveles de CoQ10 en los tejidos dependen principalmente de la síntesis de *novo* (Zhang Y, 1995). Por lo que, el incremento de la concentración de esta coenzima en el plasma, puede incluso enmascarar la deficiencia de la misma en el tejido, siendo este lugar el que posee la concentración de interés, ya que es donde se produce una significativa disminución en pacientes con enfermedades mitocondriales, cardíacas y musculares. (Ghirlanda G., 1993) (Folkers K., 1990). Estas enfermedades a su vez ocupan los primeros siete lugares en la lista de las principales causas de

mortalidad en el Ecuador, según los datos reportados por el INEC (INEC, 2010).

En los últimos años, se ha estudiado considerablemente los efectos de la administración de dosis de CoQ10 en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, entre otras, observándose que el tratamiento con esta coenzima presenta grandes beneficios terapéuticos revirtiendo, en algunos casos, las patologías mencionadas y/o en otros mejorando la calidad de vida del paciente (Matthews R, 1998) (Shults C, 2002). Todas estas enfermedades presentan una disfunción mitocondrial implicada directamente en su patogénesis, por lo que, al aumentar la cantidad disponible de Q10 en las células afectadas, ésta actúa como un agente neuroprotector del daño ocasionado por las especies reactivas de oxígeno EROS, disminuyendo el estrés oxidativo e impidiendo la muerte celular apoptótica, que es característica en estos trastornos (Storch A & Group., 2007).

Por otro lado, estudios recientes de la concentración de la coenzima Q10 plasmática relacionada con varias enfermedades neurológicas y musculares, han demostrado que, esta concentración no refleja exactamente el contenido intracelular ni del tejido de la coenzima, por lo que, es necesario realizar mediciones de la misma en otras matrices como las plaquetas y el músculo (Contin, 2011) (Duncan AJ, 2005) (Steele PE, 2004).

Observaciones realizadas por Miles (2008), al comparar la concentración de la coenzima Q10 en las plaquetas versus la encontrada en el plasma sanguíneo, demostraron que, durante la suplementación de CoQ10 a los dos tipos celulares, los niveles de la misma en las plaquetas fueron más consistentes y predecibles que los alcanzados en el plasma, concluyendo que, la medición de la coenzima Q10 en plaquetas presenta importantes ventajas sobre la medición en el plasma durante la suplementación.

Según Bhagavan y Chopra (2006), la medición de CoQ10 en linfocitos y plaquetas podría ser considerada como un potencial sustituto del estado de la coenzima Q10 en el tejido, siendo las células predilectas las plaquetas, puesto que son ricas en mitocondrias y se pueden aislar fácilmente de pequeños volúmenes sanguíneos, además, de su parentesco con las neuronas, que posibilita el estudio de los mecanismos metabólicos y bioquímicos de varios desórdenes de tipo neurológico.

Dentro de este contexto, es prioritario desarrollar metodologías analíticas que permitan la evaluación veraz de la concentración de la CoQ10 en las matrices antes mencionadas, tanto para el correcto diagnóstico de las patologías que involucran su deficiencia, así como, para la cuantificación de la absorción de la Q10 dosificada. Son necesarios sistemas analíticos y de preparación de muestra altamente sensibles, que requieran el procesamiento de pequeñas cantidades de muestra y que sean lo suficientemente sencillos para ser utilizados en laboratorios clínicos de rutina (Contin, 2011).

Hasta el presente, la técnica más utilizada para la determinación de CoQ10 es la cromatografía líquida de alto rendimiento con detección electroquímica, debido a su elevada sensibilidad (Matthews R, 1998). Sin embargo, ya que ésta requiere de largos períodos de estabilización, una instrumentación muy costosa, y tiene la desventaja de que su electrodo puede ser pasivado por componentes lipofílicos de la muestra, en algunos casos, es preferida la cromatografía líquida de alta precisión con arreglo de diodos, cuya diferencia de sensibilidad en relación a la primera, puede ser compensada con el uso de una columna miniaturizada de 1 a 2 mm de diámetro interno (Asensio Ramos M, 2009).

Con estos antecedentes, y debido a la escasez de trabajos en torno al desarrollo de metodologías de medición de CoQ10 con las células antes mencionadas, este trabajo busca estandarizar y validar una técnica de

medición de coenzima Q10 en plaquetas, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con arreglo de diodos, en las condiciones ambientales de nuestro país.

### **1.3 Objetivos de la investigación.**

#### **1.3.1 Objetivo General.**

- Estandarizar y validar un protocolo de medición de coenzima Q10 en plaquetas mediante la metodología de HPLC.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos.**

- Establecer que no existan interferencias de otros compuestos con la medición del analito (coenzima Q10) en esta metodología.
- Demostrar que los resultados de la prueba son directamente proporcionales a la concentración del principio activo, garantizando la capacidad del método para obtener resultados lineales.
- Comprobar que el método planteado es exacto y produce resultados consistentes.

### **1.4 Hipótesis.**

El protocolo óptimo para la medición de coenzima Q10, sobre la base de la metodología HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) permite la medición precisa y confiable de los niveles de CoQ10 en plaquetas.

### **1.5 Marco Teórico.**

#### **1.5.1 Coenzima Q10.**

La coenzima Q10 es una quinona isoprenoide no proteica, liposoluble, y móvil, que se encuentra naturalmente en el cuerpo. Es una provitamina sintetizada endógenamente que sirve como transportador de electrones y

colector de átomos de hidrógeno en la cadena respiratoria mitocondrial, permitiendo la formación del ATP. La designación química de su forma natural es 2,3 dimetoxi-5-metil-6-poliprenil parabenzoquinona (Ernster, 1995).

La CoQ10 es sintetizada en casi todos los tejidos del cuerpo a partir del aminoácido tirosina. Su síntesis es múltiple, la cadena lateral isoprenoide se incorpora desde la vía del mevalonato, la estructura del anillo de benzoquinona se deriva de la tirosina y la condensación de ambas estructuras se realiza a través de la enzima poliprenil transferasa. La regulación primaria de ésta biosíntesis depende de la enzima 3 hidroximetil glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA) en una reacción similar a la de la síntesis del colesterol. (Weber, 1994) (Mortensen SA, 1993).

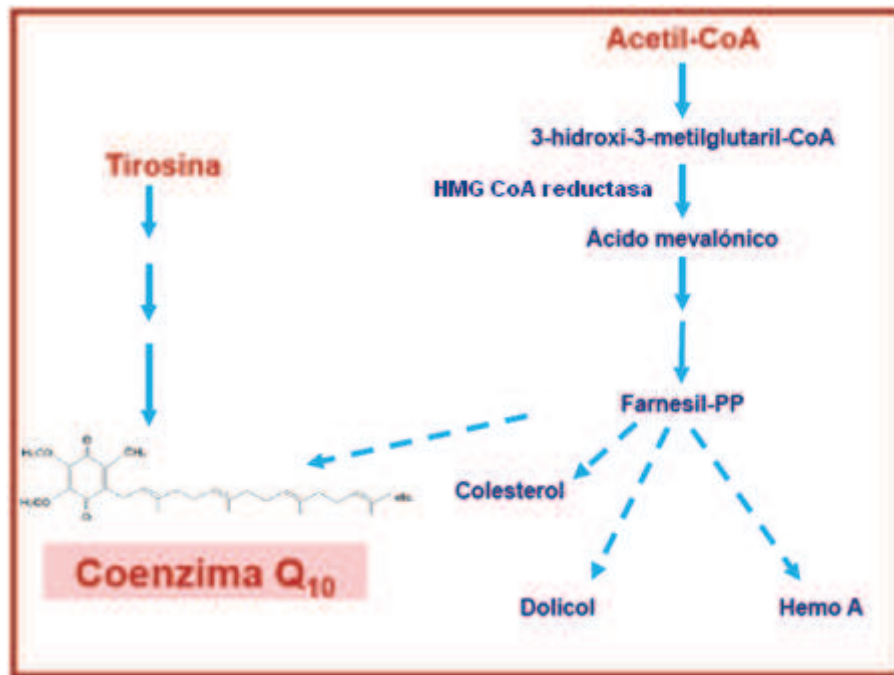


Figura 1.1: Síntesis de la coenzima Q10

Fuente: (Hospital Sant Joan de Déu - Universidad de Barcelona, 2000)

La coenzima Q10 existe en tres estados de oxidación: completamente oxidada (ubiquinona), parcialmente oxidada (semiubiquinona) y completamente reducida (ubiquinol). Además, debido a su extrema hidrofobicidad puede estar presente en tres estados físicos: formando agregados micelares, disuelta en capas bilipídicas y ligada débilmente a proteínas (Lenaz, 2001).

La mayor parte de la Q10 del organismo es sintetizada por la célula y está principalmente localizada en la mitocondria y el núcleo. Esta coenzima posee un alto grado de reciclaje en todos los tejidos, lo que evidencia que, las células poseen eficientes vías metabólicas para controlar sus niveles tisulares. Bajo condiciones normales, la producción tisular local es suficiente para los requerimientos celulares (Kagan, 1996) (Dallner, 2003).

Los niveles circulantes de coenzima Q10 en humanos son de 0,5 a 2  $\mu\text{mol/L}$ , siendo esta concentración altamente dependiente de la cantidad de lipoproteínas séricas. Se ha identificado que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) transportan el 80% del ubiquinol en la sangre (Allewa, 1995) (Kagan, 1996).

### **1.5.1.1 Funciones de la CoQ10**

#### **1.5.1.1.1 En la cadena de transporte de electrones.**

La coenzima Q10 es un componente esencial en la cadena respiratoria mitocondrial. Transfiere electrones de sustratos primarios al sistema oxidasa, el cual al mismo tiempo transporta protones al exterior de la membrana mitocondrial, obteniendo como resultado el gradiente de protones transmembrana indispensable para captar energía y formar ATP (Brandt, 1999) (Yu, 1999).

La CoQ10 permite el transporte de electrones de los complejos I y II al complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, regulando además, los dos primeros, a través de las reacciones reversibles que ocurren entre ellos. Los iones hidrógeno acumulados en el espacio intermembrana de la mitocondria debido a este comportamiento, son impulsados hacia la matriz de la misma mediante el complejo V, completando así el proceso de síntesis de ATP (Greenberg, 1990).

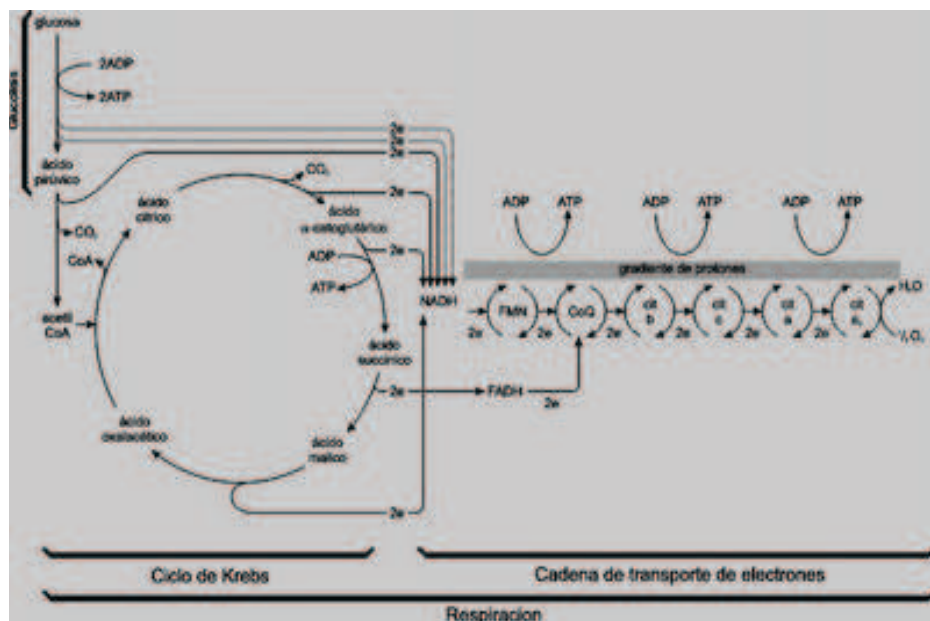


Figura 1.2: Coenzima Q10 en metabolismo mitocondrial.

Fuente: (Gómez, 2009)

### 1.5.1.1.2 Funciones antioxidantes.

La coenzima Q10 es un importante antioxidante en la membrana interna mitocondrial, ya que debido a su cercanía con las cadenas lipídicas insaturadas ésta puede remover directamente los radicales libres de las mismas. El mecanismo utilizado para dicha acción es la oxidación de los radicales mediante la reacción de reducción de ubiquinona a ubiquinol, compuesto que además regenera la vitamina E a partir del radical tocoferil (Turunen, 1999).

Se ha encontrado que la forma predominante de la coenzima Q10 en las membranas es la forma reducida y que esta se encuentra en una relación de 3 a 30 veces el contenido de vitamina E intracelular, por lo que son muy importantes las enzimas que puedan reducir cualquier radical quinona generado por la reacción con los radicales de lípidos o de oxígeno a esta forma de Q10 y mantenerla. Estas enzimas son: NADH citocromo b5 reductasa, NADH/NADPH oxidoreductasa (DT diaforasa) y NADPH coenzima Q reductasa (Villalba, 2000) (Takahashi, 1996).

Demostraciones directas de la eficacia de la CoQ10 como removedor de radicales libres han sido probadas en modelos con levaduras deficientes de la coenzima, evidenciándose una mayor formación de peróxidos lipídicos en estas levaduras que en las normales. Otra prueba concreta observada fue la eliminación de la luminiscencia de los radicales libres de la piel de personas de edad avanzada luego de la aplicación tópica de coenzima Q10 (Poon, 1997) (Hoppe, 1999).

Pero la actividad antioxidante de la coenzima Q10 no está presente solo en la membrana interna de la mitocondria, sino también en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en membranas plasmáticas e intracelulares. Estudios realizados por Mohr (1992) señalan que la CoQH<sub>2</sub> o ubiquinol, incrementa la resistencia de las LDL a la peroxidación lipídica. La CoQH<sub>2</sub> se oxida convirtiéndose en ubiquinona para reducir la oxidación de los lípidos, también puede actuar sinérgicamente con la vitamina E en estos procesos (Dallner, 2003).

#### **1.5.1.1.3 Señalización celular y expresión génica.**

La coenzima Q10 puede controlar varios aspectos de la oxidación y reducción de las células. Así su autooxidación a semiquinona en la cadena de transporte de electrones es la base para la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, molécula que a su vez activa factores de transcripción tales como el NFκB que induce la



expresión génica (Kaltschmidt, 1999). El peróxido también puede estar implicado en la señalización del calcio en el músculo cardíaco. Además, es posible que la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) promuevan la supresión de otros genes (Morad, 2000).

Otros estudios han implicado a la Q10 en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular de los glóbulos rojos y la viscosidad sanguínea. Asimismo, existen evidencias de que ésta estabiliza los canales de calcio y puede promover la apoptosis en células malignas. Esto gracias a que la coenzima Q10 tiene la capacidad de alterar la permeabilidad transitoria del poro de la membrana mitocondrial, induciendo la despolarización de la misma (Ecos de Congresos, 2000).

#### **1.5.1.2 Absorción y Transporte.**

Siendo una sustancia lipófila, la absorción de la CoQ10 sigue el mismo proceso que los lípidos en el tracto gastrointestinal. En el intestino delgado, las secreciones del páncreas y la bilis facilitan la emulsificación y formación de micelas, indispensable para la absorción de grasas. No se ha identificado un sitio específico a lo largo del intestino donde se realice la absorción de esta molécula. Similar a la vitamina E y otras sustancias lipofílicas, la Q10 es primero incorporada en los quilomicrones después de la absorción y se transporta a través de vasos linfáticos a la circulación (Katayama, 1972).

Estudios en ratas y en cultivos celulares de células humanas con  $\text{CaCO}_2$ , indican que la coenzima Q10 se reduce a ubiquinol durante o después de la absorción en el intestino (Craft, 2005).

Después de la absorción, el ubiquinol aparece como parte de las lipoproteínas mesentéricas ricas en triglicéridos. Estas son convertidas a quilomicrones remanentes en la circulación por lipoproteínas lipasas e

inmediatamente son tomadas por el hígado, donde, la CoQ10 es reempaquetada en su mayoría en partículas de VLDL/LDL y liberada de nuevo a la circulación (Elmberger, 1989) (Traber, 1992).

#### **1.5.1.2.1 Absorción tisular de la Q10.**

Dado que la CoQ10 es sintetizada de *novo* en todos los tejidos, se presume que en condiciones normales éstos no dependen de la suplementación exógena. No existe evidencia al momento que demuestre que la coenzima Q10 de la dieta que es secretada a la circulación y tomada por el hígado, sea utilizada por otros tejidos bajo condiciones rutinarias. Sin embargo, el contenido de Q10 en los tejidos está regulado por factores fisiológicos como el estrés oxidativo y el envejecimiento, pudiendo estar gravemente comprometido en muchas condiciones fisiopatológicas (Ernster, 1995) (Overvad, 1999) (Langsjoen, 1999).

En un estudio con ratas a las que se les administró oralmente coenzima Q10, se observó que ésta aparece en la circulación, hígado y bazo más no en el corazón o riñón, además, que la Q10 encontrada en el hígado resultó ser dosis dependiente sobre los 12mmol/100gr de peso corporal (Zhang Y, 1995).

#### **1.5.1.3 Farmacocinética.**

La Coenzima Q10 es una sustancia lipofílica, por lo que, el primer paso en la toma de la suplementación externa es su incorporación dentro de los quilomicrones, a través de los cuales, se transportará en la linfa y en la sangre periférica. La única forma en que la CoQ10 presenta biodisponibilidad absoluta es por vía intravenosa, más, debido a que esta presentación no está disponible para humanos, medir dicha biodisponibilidad no es posible. Sin embargo, el tiempo del perfil de absorción y distribución seguido por la Q10, luego de la administración oral puede ser un dato útil para estimar el parámetro antes mencionado (Miles M. , 2007).

Estudios farmacocinéticos han demostrado que después de la administración oral, los niveles de la Q10 plasmática empiezan a incrementarse dentro de las dos primeras horas. El tiempo en el que se alcanza la mayor concentración plasmática de Q10 ocurre en el rango de las 6 a 8 horas de la ingesta. E inesperadamente, un segundo pico de Q10 plasmática aparece a las 24 horas de la suplementación (Tomono, 1986) (Weis, 1994) (Miles M. H., 2002) (Miles M. , 2007).

El sitio exacto del intestino delgado en el cual se realiza la toma de la CoQ10 exógena no se ha podido determinar en humanos, más varios modelos experimentales en ratones muestran que el duodeno exhibe mayor permeabilidad a la Q10, seguido del colon, íleon y yeyuno, respectivamente (Palamakula, 2005).

La absorción de la Q10 es un proceso complejo que involucra mecanismos de transporte activos y pasivos. Siendo la absorción no lineal la que se lleva a cabo en la mayor parte del proceso. La permeabilidad del íleon y colon soporta la posibilidad de una recirculación enteropática de la CoQ10, lo que explicaría la aparición del pico de Q10 a las 24 horas, por lo cual, mayores estudios son necesarios para verificar esta premisa (Palamakula, 2005).

#### **1.5.1.4 Relación con procesos patológicos.**

La evidencia creciente de la participación de la fosforilación oxidativa en los procesos patológicos como: la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Huntington, entre otros, han contribuido al conocimiento de que una alteración en el estado redox de la CoQ10 puede reflejar un cambio, tanto en la cadena de transporte de la membrana, como en la efectividad de la defensa antioxidante contra las especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno y el superóxido (Ecos de Congresos, 2000) (Brandt, 2000).

En este contexto, en la enfermedad de Parkinson, existen evidencias de que el deterioro de la función mitocondrial y el daño oxidativo son factores que contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad. Así, la disfunción del Complejo I de la mitocondria está implicado en su patogénesis (Mancuso, Coppede, Migliore, Siciliano, & Murri, 2006).

Recientes estudios han reportado que un déficit en los niveles de CoQ10 cerebral está envuelto en la patofisiología de los pacientes con Parkinson (Hargreaves, Lane, & Sleiman, 2008) y que la actividad de la cadena de transporte de electrones, misma que se encuentra disminuida en los fibroblastos de la piel de estos pacientes, es restablecida en presencia de Q10 aplicada directamente a un cultivo de dichos fibroblastos (Winkler-Stuck, Wiedemann, Wallesch, & Kunz, 2004).

El rol neuroprotector de la CoQ10 también ha sido estudiado en modelos celulares de la enfermedad de Parkinson, en los cuales, se indujo a apoptosis a un cultivo de neuronas dopaminérgicas, y luego de observar su efecto, se suministró cantidades variables de Q10, obteniendo como resultado la disminución del efecto apoptótico en dichas células (Kooncumchoo, Sharma, Porter, Govitrapong, & Ebadi, 2006).

En la Isquemia miocárdica, se ha determinado que existe una acción protectora de la CoQ10 en la injuria mediada por el estrés oxidativo de este trastorno. Estudios realizados en modelos aislados de ratas en los que se evaluó el efecto de la Q10 respecto a la hiperactividad coronaria de la isquemia/reperfusión, afirmaron que, la administración previa de la coenzima previene la disfunción del endotelio, al mismo tiempo que reduce el nivel de radicales libres durante las primeras etapas de la reperfusión (Yokoyama H, 1996).

Asimismo, la enfermedad de Alzheimer, ha sido asociada con el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial. En modelos experimentales, se ha encontrado que, la CoQ10 exógena protege a las células del neuroblastoma de los efectos neurotóxicos  $\beta$ -amiloides, mismo efecto ha sido observado también en modelos de cerebros de ratones diabéticos, donde la suplementación de Q10 produjo una atenuación de la fosforilación oxidativa y evitó el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno inducido por el péptido neurotóxico (Mancuso M. C., 2006) (Wadsworth, 2008) (Moreira, 2005).

### **1.5.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).**

Según la IUPAC (1974), *“La Cromatografía es un método usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa.”* (IUPAC, 1974).

Se pueden clasificar las modalidades de la Cromatografía de diversas formas, sin embargo, la más usada es según la naturaleza de su fase móvil, la cual señala dos tipos de modalidades cromatográficas: cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía líquida (LC). Esta última a su vez se subdivide en: Cromatografía en capa delgada (TLC), Cromatografía líquida en columna abierta y Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Quattrochi, 1992).

La diferencia fundamental entre HPLC y GC se encuentra en el tipo de detectores y en la influencia de la fase móvil. En GC es muy simple encontrar detectores que diferencien la muestra de la fase móvil (gas inerte), sin embargo, en el HPLC, esto no es así, ya que la fase móvil no solo no es inerte sino que su masa es sensiblemente superior. Asimismo, en GC, la fase móvil es un simple carrier del soluto, que prácticamente no influye en la separación,

por el contrario, en HPLC, la fase móvil es el parámetro fundamental que gobierna la separación (Meyer, 1997).

En la Cromatografía gaseosa se requiere de muchas columnas para abarcar el rango de separaciones posibles, mientras que en HPLC con una sola columna es posible separar sustancias polares, iónicas, ionizables y no polares, simplemente modificando la composición de la fase móvil (Quattrochi, 1992).

La modalidad cromatográfica HPLC constituye por tanto, la técnica de separación de analitos con más resolución y selectividad disponible hasta la actualidad, por lo cual, es la más utilizada de todos los tipos de cromatografía de elución, conociéndose como tal, al desplazamiento de un soluto a través de la fase estacionaria por el movimiento de una fase móvil (Rouessac, 2003).

#### **1.5.2.1 Bases de la Separación.**

Cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así, el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y toma un mayor tiempo en eluir (salir de la columna), mientras que el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes (Meyer, 1997).

#### **1.5.2.2 Sistema Cromatográfico.**

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

- Un reservorio del solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: inyector.

- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector: software-computador (Hernández, 2002).

Los **recipientes** que se utilizan para almacenar la fase móvil deben ser inertes, para evitar que los solventes extraigan alguna partícula del material con el que son construidos. A menudo estos recipientes son botellas de vidrio y tubos de teflón provistos de filtros para eliminar gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil (Hernández, 2002).

Debido a que algunas fases móviles usadas en el HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema que están en contacto con dicha fase, estén fabricados con materiales resistentes, como el acero inoxidable (Harris, 2001).

Así, las columnas cromatográficas están fabricadas de este acero, con longitudes que varían de 5 a 30cm, diámetros de 1 a 5mm y tamaño de partícula entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ . El material de relleno de estas columnas suele ser partículas microporosas de sílice muy puro que son permeables al disolvente (Harris, 2001).

Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones de tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol, mismos que deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados (Harris, 2001).

En cuanto a las **bombas**, estas deben cumplir las siguientes características:

- Generar presiones superiores a 6000psi.
- Ser capaces de cubrir un rango de flujo entre: 0,1 y 10ml/min, con una precisión del 0,5% y que esté libre de pulsaciones.
- Ser construidas con materiales inertes respecto a los componentes empleados.

Existen tres tipos de bombas:

*Las recíprocas o de vaivén*, son las más utilizadas, y están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por un pistón de zafiro, produciendo un flujo pulsado que después debe amortiguarse. La ventaja de este tipo de bomba es que consigue presiones elevadas y suministra un caudal constante a cualquier condición de gradiente utilizado (Rouessac, 2003).

*Las bombas neumáticas o de presión constante*, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente que contiene la fase móvil, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas (Hernández, 2002).

*Las bombas de desplazamiento o tipo jeringa*, que constan de una cámara equipada con un mecanismo de tornillo mediante el cual suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a alrededor de 250ml (Loro, 2001).



Hay varios tipos de **inyectores**, el más sencillo, es aquel que emplea una jeringa de alta presión con un diafragma o septum a la entrada de la columna, sin embargo, está limitado a una presión máxima de operación de 1500 psi. Por lo que, las válvulas de inyección con bucles de volumen conocido, son el método más utilizado (Harris, 2001).

El **detector**, es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. Este depende de la naturaleza de la muestra y debe reunir ciertas características como: sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad, amplio margen de respuesta lineal, insensibilidad a cambios de presión y temperatura, entre otras (Meyer, 1997).

Se conocen varios tipos de detectores:

Detectores de absorbanza ultravioleta, son los más utilizados y se fundamentan en la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Dentro de estos, los más potentes son aquellos que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Sus datos de absorbanza se presentan en función de la longitud de onda y del tiempo (Hernández, 2002).

Detectores de fluorescencia, son muy sensibles y selectivos, su principio de operación se basa en la irradiación con luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste (Loro, 2001).

Detectores electroquímicos, son mucho más sensibles que los detectores UV y altamente selectivos. Su selectividad se debe no solo a que detectan compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, sino que pueden reducir el número de compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado (Quattrochi, 1992).

### **1.5.3 Validación de métodos analíticos.**

La validación de un método, es el proceso de definir una necesidad analítica y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere la aplicación. Generalmente se considera que la validación del método está estrechamente ligada al desarrollo del método. De hecho, no es posible determinar con exactitud en donde termina el desarrollo del método y en donde comienza la validación (Eurachem, 2005).

En el proceso de validación del método está implícito el uso de equipos dentro de las especificaciones, con funcionamiento adecuado y que estén calibrados adecuadamente. Asimismo, el operador debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y poseer el conocimiento suficiente sobre el trabajo a realizar, para que de esta forma sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones realizadas durante el estudio (Eurachem, 2005).

Existen varias formas de llevar a cabo una validación, de acuerdo a sus objetivos y alcances, los cuales dependen del analista, del laboratorio y del uso que se haga del método; además, el analista debe conocer los resultados esperados y definir el nivel de confianza. El laboratorio que desarrolla o aplica el método es el responsable del proceso de validación (Chung Chow Chan, 2004).

### **1.5.3.1 Importancia de la Validación.**

La validación de métodos analíticos es muy importante, tanto en los laboratorios de investigación, como en los de rutina, ya que establece de forma veraz y confiable, bajo qué circunstancias debe realizarse un análisis para que los resultados obtenidos cumplan en su totalidad la calidad deseada, proporcionando además criterios para el rechazo o reanálisis de lecturas anómalas (Bedoya, 2009).

Los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad y propósito perseguido, ya que muchas de las decisiones que se toman a partir de éstos, están basadas en la información que estos datos proporcionan. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables (Eurachem, 2005).

En el Ecuador, así como en muchos países del mundo, todo laboratorio de ensayo y calibración para estar en funcionamiento, debe validar adecuadamente sus metodologías de acuerdo a los requerimientos establecidos por la norma ISO/IEC 17025 que dice: *“los laboratorios deben validar todos los métodos que se utilicen en el laboratorio, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios. Además, también es necesario que el laboratorio valide los métodos de referencia aunque, en este caso, no es necesario que el laboratorio realice una validación completa”* (Organismo de Acreditación Ecuatoriano - OAE, 2005).

### **1.5.3.2 Desarrollo del método.**

El desarrollo de un método puede tomar varias formas. Desde un extremo, puede involucrar el adaptar un método existente realizando cambios menores de tal manera que sea adecuado a su nueva aplicación. Esto contempla por ejemplo, la medición de un diferente analito con propiedades semejantes al original en la misma matriz de análisis, de forma que se utilicen iguales o similares principios de aislamiento, identificación y cuantificación del mesurando inicial.

Al otro extremo, el químico analítico puede iniciar con algunas ideas burdas y aplicar su experiencia y su pericia para diseñar un método adecuado. Esto puede involucrar una innovación importante basada en una explotación novedosa de las propiedades conocidas del analito o mensurando. Sin embargo, esto involucra un excelente manejo de más trabajo y, al menos inicialmente, un cierto grado de duda de si el método final será exitoso. No es poco frecuente que para el desarrollo de un método se deba trabajar con diferentes ideas simultáneamente y eventualmente escoger la mejor (Eurachem, 2005).

### **1.5.3.3 Parámetros de desempeño del método.**

#### **1.5.3.3.1 Exactitud.**

Se define como exactitud, a la proximidad o grado de concordancia entre los resultados de la prueba y el valor verdadero: valor consistente con la definición de una cantidad particular dada. La exactitud de un método se cuantifica evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados.

Normalmente este parámetro se estudia a través de dos componentes: la veracidad y la precisión. La veracidad expresa que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados respecto del valor real, en términos de

sesgo, y puede ser calculada a través del porcentaje de recuperación de un compuesto de concentración conocida añadido a un grupo control. La precisión en cambio, es una medida de que tan cercanos se encuentran los resultados entre sí y por lo general se expresa en términos de la desviación estándar (FDA, 2000).

Adicionalmente, una expresión cada vez más común de exactitud es la “incertidumbre de medición”, la cual proporciona una figura única de expresión de la exactitud (Dux, 1986) .

#### **1.5.3.3.2 Precisión.**

La norma ISO 3354 [ISO 1993] define la precisión como “*el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas*”. Estas condiciones dependen de los factores que se varíen entre cada uno de los ensayos. Por ejemplo, algunos de los factores que se pueden variar son: el laboratorio, el analista, el equipo, la calibración del equipo, los reactivos y el día en que se realiza el ensayo (ISO/TAG4/WG3, 1993).

Las dos medidas de precisión extremas son la reproducibilidad (la precisión más grande esperada) y la repetibilidad (la precisión más pequeña esperada). La repetibilidad es la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo, en un período corto de tiempo. Por el contrario, la reproducibilidad, representa la variabilidad de una muestra cuando ésta es analizada por diferentes laboratorios, por lo que, en algunos casos es más útil una medida intermedia de la precisión, por ejemplo, la precisión medida entre diferentes analistas, en períodos de tiempo prolongados, dentro de un solo laboratorio, a lo que se le conoce como precisión intermedia (Eurachem, 2005).

#### **1.5.3.3.3 Robustez.**

El estudio de robustez dentro del laboratorio permite evaluar el comportamiento de un proceso analítico cuando se efectúan pequeños cambios en las condiciones ambientales y/o de operación, semejantes a aquéllos que pudieran surgir en los diferentes ambientes de prueba. (Methods, 1998).

La aplicación de variaciones deliberadas durante la implementación del método posibilita el estudio de su efecto en el desempeño del mismo, identificando así las variables con efectos más significativos, para en base a ello poder controlarlas cuidadosamente cuando se aplique el método. Las pruebas de robustez se usan normalmente para investigar su efecto sobre la precisión y la exactitud del método analítico de interés (Eurachem, 2005).

#### **1.5.3.3.4 Límite de detección.**

Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante saber cuál es la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método. El límite de detección de un método analítico es la mínima concentración o masa del analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado.

Normalmente, para propósitos de validación es suficiente proporcionar un indicativo del nivel al cual la detección resulta problemática. Para este propósito la aproximación “blanco + 3s” usualmente es suficiente. En estudios donde no es posible el acceso a un blanco, se toma como nivel de confianza al doble de la señal emitida por el ruido del equipo (Carson, 1990).

#### **1.5.3.3.5 Límite de cuantificación.**

El límite de cuantificación (LoQ) estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad y veracidad. También se define por diversas convenciones como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Algunas veces también se lo conoce como “límite de determinación”.

En definitiva, ni el límite de detección ni el de cuantificación, representan niveles a los cuales la cuantificación sea imposible. Simplemente son límites donde el tamaño de las incertidumbres asociadas se hace comparable con el resultado real en la región del LoD (Eurachem, 2005).

#### **1.5.3.3.6 Linealidad.**

La linealidad, es la capacidad del método analítico para demostrar que los resultados de la prueba (respuesta) son directamente proporcionales a la concentración del principio activo. Existen dos límites en la curva de linealidad: el límite de la concentración inferior, que está dado por el límite de detección o cuantificación y el límite superior, que se encuentra definido por un porcentaje de desviación arbitrario de la curva de linealidad (Carson, 1990).

La linealidad es determinada por una serie de tres a seis inyecciones con cinco o más concentraciones del estándar de interés, encontradas dentro del rango del 80 al 120 por ciento de la gama de concentración esperada en las muestras (EPA, 1995).

#### **1.5.3.3.7 Intervalo de trabajo (Rango).**

El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior (incluyendo estos niveles) que han demostrado ser determinados con precisión, exactitud y linealidad, utilizando el método descrito. Este se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados del método.

Para las pruebas de ensayo, la ICH requiere que el rango mínimo especificado sea del 80 al 120 por ciento de la concentración de la prueba y para la determinación de una impureza, el rango se extienda al límite de cuantificación o desde el 50 al 120 por ciento de la especificación de cada impureza (ICH, 1996).

#### **1.5.3.3.8 Confirmación de identidad y Selectividad/Especificidad.**

La confirmación de identidad establece que la señal producida por el instrumento de medición durante la etapa de medición o en alguna otra etapa, se debe únicamente al analito y no a la presencia de alguna otra sustancia química o físicamente similar o que surja como una coincidencia.

La interferencia de otros compuestos en la medición del analito, dependerá de la efectividad de la etapa de separación y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición (Eurachem, 2005).

Los términos especificidad y selectividad se usan indistintamente, pero el primero, generalmente se refiere a la capacidad de un método para producir una respuesta de un analito solamente, mientras que el segundo, indica que el método proporciona respuestas para un número de entidades químicas que pueden o no distinguirse unas de las otras.



La especificidad se considera es el 100 % de la selectividad pero el acuerdo no es universal. La selectividad y la especificidad son medidas que garantizan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias (ICH, 1996) (EPA, 1995).

#### **1.5.3.3.9 Incertidumbre.**

La incertidumbre de medición es un parámetro único (usualmente una desviación estándar o un intervalo de confianza) que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los resultados de medición. Una estimación de la incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado. Las incertidumbres asociadas a cada efecto son combinadas de acuerdo a procedimientos bien establecidos.

La estimación de la incertidumbre en química analítica debe considerar:

- La precisión total del método en un período largo de tiempo.
- El sesgo y su incertidumbre, incluyendo la incertidumbre estadística asociada a las mediciones del sesgo y la incertidumbre del material de referencia o del método.
- Incertidumbres de calibración, se considera que la mayoría de las incertidumbres de calibración de equipos serán despreciablemente pequeñas en comparación con la precisión total y la incertidumbre en el sesgo, por lo que, solo deberán ser verificadas.
- Debe adicionarse cualquier otro efecto significativo que actúe además de los anteriores y que pudo no haberse aplicado totalmente en un estudio de validación. Dichos efectos pueden ser cuantificados por estudios de robustez o estudios relacionados que establezcan el tamaño de un efecto dado sobre el resultado (Ellison, 1996).

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes.**

El presente estudio fue realizado por la Srta. Myrian Ibeth Chiluiza Jácome, egresada de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército con la dirección académica del Dr. Marcelo Grijalva, Ph.D. y la codirección del Ing. Pedro Romero Saker. Se contó con la supervisión técnica de la Lcda. Marcia Racines Orbe, responsable de la línea de investigación de la coenzima Q10 del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, donde se llevó a cabo el proyecto.

### **2.2 Zona de estudio.**

Los trabajos de recolección de muestras de sangre y los análisis de laboratorio se llevaron a cabo en la ciudad de Quito-Ecuador. La Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador sirvió como sede para la toma de muestras, mientras que los análisis de laboratorio se realizaron en el área de cromatografía de los laboratorios del Centro de Biomedicina de la misma universidad.

### **2.3 Período de investigación.**

La parte experimental de este estudio inició el 19 de abril del 2011 y concluyó el 28 de junio del 2012.

### **2.4 Diseño y Análisis de datos.**

Para la validación del método propuesto, se establecieron los siguientes objetivos de validación:

- Incertidumbre del método menor al 30%.
- Robustez del método dentro del rango de 90 a 110 por ciento de recuperación de la muestra.

- Precisión (repetibilidad y reproducibilidad): establecida como la diferencia absoluta de dos mediciones de la misma muestra menor o igual a 0,05.
- Linealidad (correlación) igual o mayor a un  $R^2$  de 0,99.
- Veracidad (porcentaje de recuperación) mayor o igual al 90%.

Por lo que, para comprobar cada uno de los objetivos establecidos, fue necesaria la utilización de parámetros estadísticos tales como: desviación estándar, intervalos de confianza, medidas de incertidumbre, coeficientes de correlación, estadístico F para dos muestras, entre otros. Además, de un diseño experimental de bloques completamente aleatorizado (DBCA) para la determinación de los criterios de precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad).

Los paquetes de software de análisis estadístico usados fueron: el software estadístico InfoStat versión estudiantil y el programa Microsoft Excel versión 2010.

## **2.5 Criterios de inclusión de muestras.**

A este estudio ingresaron personas de sexo masculino o femenino, de nacionalidad ecuatoriana, cuyas edades se encuentran dentro del rango de 18 a 30 años, que aceptaron participar en esta tesis previa firma del consentimiento informado, con el requisito de no haber ingerido ningún medicamento los últimos tres meses previos al estudio y no presentar ningún trastorno metabólico aparente.

## **2.6 Criterios de exclusión de muestras.**

No fueron candidatos de este estudio, personas que no desearon participar en el mismo o que no cumplían con los criterios de inclusión.

## 2.7 Procedimientos.

### 2.7.1 Estandarización del método.

Se evaluó el método candidato propuesto por Contin (2011) bajo las condiciones del laboratorio de Cromatografía del Centro de Biomedicina de la UCE, siendo el protocolo el siguiente:

#### *Preparación de la muestra.*

- Extraer 2,5 ml de sangre periférica en tubos citratados, de voluntarios sanos con 8 h de ayuno.
- Decantar dicha sangre hasta que la fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) corresponda aproximadamente al 10% del volumen de sangre total.
- Tomar una alícuota de 10  $\mu$ l del PRP obtenido, para efectuar el recuento manual de plaquetas en la cámara de Neubauer.
- Tomar una alícuota de 400  $\mu$ l de PRP y centrifugarla a máxima velocidad durante 20 min a temperatura ambiente (se probó con 14000 rpm).
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet de plaquetas con buffer Tris 10 mM pH= 7,40, utilizando vórtex a baja velocidad durante 1 min.
- Repetir la centrifugación anterior y descartar el buffer para la obtención del pellet de plaquetas.
- Adicionar 800  $\mu$ l de 1-propanol frío y agitar la mezcla en vórtex a máxima velocidad durante 2 min.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 10 min.
- Tomar la fase orgánica y evaporarla a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno.
- Reconstituir el residuo en un volumen final de 200  $\mu$ l de fase móvil con 10% de 1-propanol.

Las condiciones cromatográficas usadas en el paper fueron: fase móvil metanol-isopropanol 80:20, flujo: 0,6ml/min, volumen de inyección 10 $\mu$ l, corrida

isocrática y temperatura ambiente. La columna de separación utilizada fue una Agilent Hypersil ODS de 150mm x 2mm y 3um.

La instrumentación del laboratorio para el análisis de las muestras constó de:

- Equipo de HPLC marca Alliance Waters con módulo de separación modelo W2690D/5D y detector UV con arreglo de diodos modelo W2998.
- Columna de separación Symmetry<sup>®</sup> C-18 Waters de dimensiones 2,1mm x 20mm x 3,5um.
- Precolumna Symmetry<sup>®</sup> C-18 de 5um Waters.
- Software de procesamiento de resultados cromatográficos: Empower 2.

En vista de que los resultados obtenidos con este protocolo no fueron satisfactorios y de que el mismo no proporcionaba datos suficientes tanto para la preparación de la muestra como para su cuantificación, se probaron y optimizaron los siguientes parámetros:

- Centrifugación del PRP: se probaron centrifugaciones de 4000rpm, 10000rpm, 11000rpm y 14000rpm con tiempos de centrifugación de 10, 15 y 20 minutos cada una.
- Centrifugación del pellet de plaquetas con 1-propanol: se probaron centrifugaciones de 4000rpm, 10000rpm y 14000rpm con 10 y 15 minutos de centrifugado.
- Procesamiento del pellet con y sin lavado con el buffer Tris 10 mM pH= 7,40.
- Volumen de partida del PRP (400ul, 600ul y 800ul).
- Volumen de partida de la sangre total (2,5ml y 4,5ml).
- Volumen de adición del 1-propanol al pellet: 200ul, 400ul y 800ul.

- Volumen de la solución de reconstitución del residuo seco. Se utilizó 100 y 200ul de la fase móvil metanol: 1-propanol relación 60/40.

Por otro lado, al no contar con suficiente cantidad de isopropanol para el procesamiento de las muestras y no tener posibilidades de su adquisición, se probaron las siguientes fases móviles para la corrida de las muestras: metanol 60%: 1-propanol 40%, metanol 70%: 1-propanol 30% y metanol 80%: 1-propanol 20%.

Y finalmente se optimizaron las siguientes condiciones cromatográficas:

- Flujo: se probaron flujos de 0,3ml/min, 0,4ml/min y 0,5ml/min.
- Temperatura de la muestra. Se utilizó 4°C  $\pm$ 2 y 8°C  $\pm$ 2.
- Temperatura de la columna. Se utilizó 25°C  $\pm$ 5 y 30°C  $\pm$ 5.
- Volumen de inyección: 10ul, 20ul, 50ul y 90ul.
- Absorbancia: se detectaron las muestras a longitud de onda abierta de 210 a 400nm.

## **2.7.2 Validación del método.**

### **2.7.2.1 Exactitud, Precisión y Robustez**

Para determinar la exactitud, precisión y robustez del método se corrieron 10 muestras de la persona número 1 y 5 muestras de la persona número 2, el día 1 de este ensayo. Al día siguiente (día 2), se corrieron otras 10 muestras de la persona número 1, pero esta vez adicionadas con una cantidad conocida del estándar de coenzima Q10 (estándar marca BioChemika de pureza mayor al 99%, específico para HPLC) y 5 muestras de la persona número 2, igualmente espigueadas.

A los 8 y 9 días del inicio del ensayo, se corrieron 5 muestras normales y 5 muestras espiqueadas de la persona número 2, respectivamente, utilizando los mismos estándares de la vez anterior.

Adicionalmente, y sólo para la prueba de precisión del método, se tomaron también en cuenta las concentraciones obtenidas de los 10 blancos de muestra corridos para determinar el límite de detección y cuantificación, así como las 10 concentraciones resultantes de las repeticiones del límite de cuantificación del método. Esto, para tener dos grupos de muestras a 3 niveles de concentración, en dos períodos de tiempo: uno corto, igual o menor a 3 días (necesario para determinar el criterio de repetibilidad), así como, uno más largo, entre una semana y un mes (requisito del criterio de reproducibilidad). En la tabla a continuación se detalla el diseño de esta prueba:

Tabla 2.1: Disposición de las muestras para determinar los parámetros de precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad).

ID. MUESTRA	REPETIBILIDAD	REPRODUCIBILIDAD	NIVEL	DÍA
BLANCOS	10 REPETICIONES		BAJO	0
PERSONA N. 1	10 REPETICIONES		MEDIO	1
PERSONA N. 1 + STD CONOCIDO	10 REPETICIONES		ALTO	2
L.CUANTIFICACIÓN		5 REPETICIONES	BAJO	0
L.CUANTIFICACIÓN		5 REPETICIONES	BAJO	7
PERSONA N. 2		5 REPETICIONES	MEDIO	1
PERSONA N. 2		5 REPETICIONES	MEDIO	8
PERSONA N. 2 + STD CONOCIDO		5 REPETICIONES	ALTO	2
PERSONA N. 2 + STD CONOCIDO		5 REPETICIONES	ALTO	9

### **2.7.2.2 Límite de detección y cuantificación.**

Para determinar el límite de detección y cuantificación se corrieron 10 blancos de muestra preparados de la siguiente manera:

Se adicionaron 3ul del estándar de Q10 0,75uM y se mezclaron con 27ul de fase móvil, obteniendo una concentración del 10% del promedio de las muestras (concentración requerida para este procedimiento). Luego se disolvió esta solución en 100ul más de fase móvil, emulando el proceso seguido por las muestras.

De la lectura obtenida de estos blancos, se establecieron las concentraciones de ambos límites de la siguiente forma:

$$LD = X_{\text{blancos}} + 3S_{\text{blancos}} ; \quad LC = X_{\text{blancos}} + 10S_{\text{blancos}}$$

Con dichas concentraciones se corrieron 10 estándares preparados al límite de detección y 5 estándares preparados al límite de cuantificación, el día 1 de esta prueba. El día 8 se realizó lo propio con cinco estándares preparados al límite de cuantificación.

### **2.7.2.3 Linealidad.**

Para definir la linealidad del método, así como el límite superior (LSC) e inferior de control (LIC) de la curva de calibración, se prepararon 4 curvas con el siguiente rango de concentraciones: 0,1uM - 0,5uM – 0,75uM – 1uM – 1,5uM y 2uM.

El procedimiento seguido para la preparación de cada una de dichas curvas fue el siguiente:



Se pesó 0,0043gr del estándar de coenzima Q10 y se diluyó en 200ul de cloroformo y 4800ul de 1-propanol, obteniéndose una solución de concentración 1mM.

A partir de esa solución, se formaron los siguientes estándares líquidos:

STD 100uM: Preparado con 25ul del STD 1mM y 225ul de fase móvil (FM).

STD 10uM: Preparado con 25ul del STD 100uM y 225ul de FM.

STD 1uM: Preparado con 50ul del STD 10uM y 450ul de FM.

STD 0,1uM: Preparado con 20ul del STD 1 y 180ul de FM.

STD 0,5uM: Preparado con 125ul del STD 1 y 125ul de FM.

STD 0,75uM: Preparado con 150ul del STD 1 y 50ul de FM.

STD 1,5uM: Preparado con 30ul del STD 10 y 170ul de FM.

STD 2uM: Preparado con 40ul del STD 10 y 160ul de FM.

Cabe recalcar que todos los reactivos usados en el desarrollo de esta prueba y todas las pruebas realizadas en el presente estudio, fueron previamente filtrados con una membrana de 0,4um. Todas las muestras corridas (estándares o muestras biológicas) se procesaron usando puntas con filtro de 0,2um.

#### **2.7.2.4 Confirmación de identidad: selectividad/especificidad.**

Para el análisis de este parámetro se corrieron juntos y por separado todos los reactivos que intervienen tanto en la preparación de la muestra como en su corrida en el equipo de HPLC. Los reactivos inyectados fueron: 90ul de 1-propanol grado HPLC, 90ul de metanol de la misma pureza, y 90ul de la fase móvil en la que eluyen las muestras: metanol 60%: 1-propanol 40%.

### 2.7.2.5 Incertidumbre.

Para este criterio de calidad del método se tomaron en cuenta todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado de las muestras, siendo estos los siguientes:

Desviación estándar de reproducibilidad, repetibilidad, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, rango y linealidad. Adicionalmente, las incertidumbres asociadas a los certificados de calibración o pureza, según el caso, de: la balanza analítica, las micropipetas, la resolución de la balanza y el estándar de coenzima Q10.

Valores a partir de los cuales se calcularon las incertidumbres:

$$\text{Incertidumbre estándar } (\mu) = \sqrt{\sum \mu^2 + \sum \sigma^2}$$

$$\text{Incertidumbre expandida } (U) = \mu * \mathcal{K}$$

Dónde:  $\sigma^2$  representa la desviación estándar de los criterios de calidad del método elevada al cuadrado y  $\mu^2$  es el símbolo de las incertidumbres de calibración o pureza, de los instrumentos de medición y los estándares usados en el método, también al cuadrado.  $\mathcal{K}$  es el factor de cobertura que se usa para expandir la incertidumbre estándar con un nivel de confianza del 95%.

En la figura a continuación, se esquematizan las fuentes de incertidumbre del presente método.

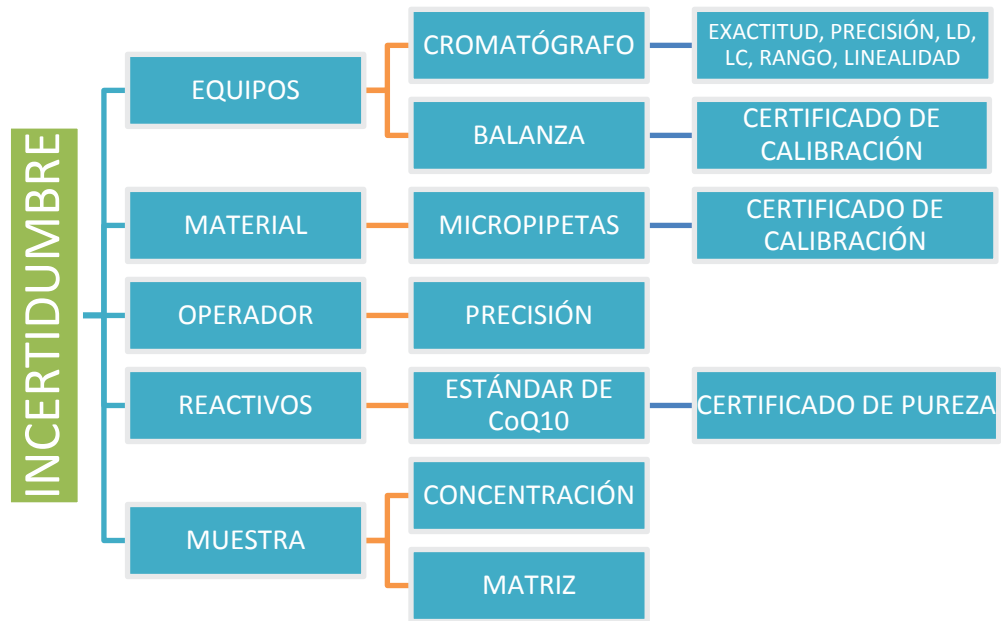


Figura 2.1: Fuentes de incertidumbre del método actual.

Asimismo, se describe la clasificación de dichas fuentes:

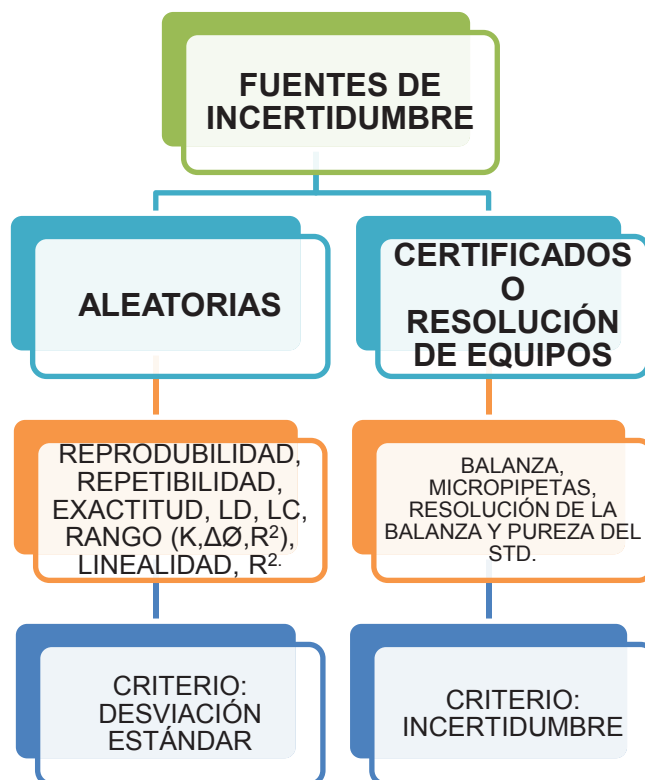


Figura 2.2: Clasificación de las fuentes de incertidumbre del método actual.

### 2.7.3 Muestras.

Con la técnica validada, se corrió un grupo de 35 muestras por duplicado, que cumplieran con los criterios de inclusión del presente estudio: provenientes de personas de sexo masculino o femenino, de nacionalidad ecuatoriana, cuyas edades se encuentren dentro del rango de 18 a 30 años, que hayan aceptado participar en esta tesis previa firma del consentimiento informado, con el requisito de no haber ingerido ningún medicamento los últimos tres meses previos al estudio y no presentar ningún trastorno metabólico aparente.

Para la distribución entre géneros del número de muestras se consideró el cincuenta por ciento.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS

### 3.1 Principales parámetros modificados del protocolo de referencia.

#### 3.1.1 Composición de la fase móvil.

Como resultado de evaluar el comportamiento del estándar de prueba (estándar de CoQ10 2uM) en las tres fases móviles candidatas: metanol 60%: 1-propanol 40%, metanol 70%: 1-propanol 30% y metanol 80%: 1-propanol 20%, se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 3.1: Respuesta cromatográfica del estándar 2uM de CoQ10 a las tres fases móviles de prueba.

FASE	°T/R (minutos)	ÁREA (unidades AU)	ALTURA (unidades AU)
1	4,09	315395	17827
1	4,14	315555	18168
1	4,15	317202	18074
2	2,84	315582	23160
2	2,84	316290	23598
2	2,84	316345	23287
2	2,84	318437	24070
2	2,84	318066	23658
3	6,52	310986	12636
3	6,58	311198	12736
3	6,58	310664	12669

Nomenclatura: fase 1: metanol 70%: 1-propanol 30%; fase 2: metanol 60%: 1-propanol 40% y fase 3: metanol 80%: 1-propanol 20%.

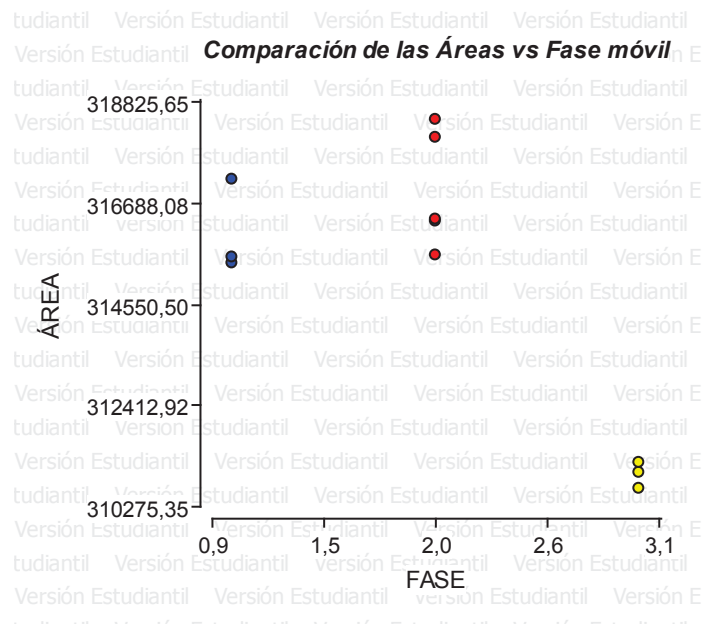


Figura 3.1: Áreas obtenidas del estándar de CoQ10 2uM según las fases móviles probadas.

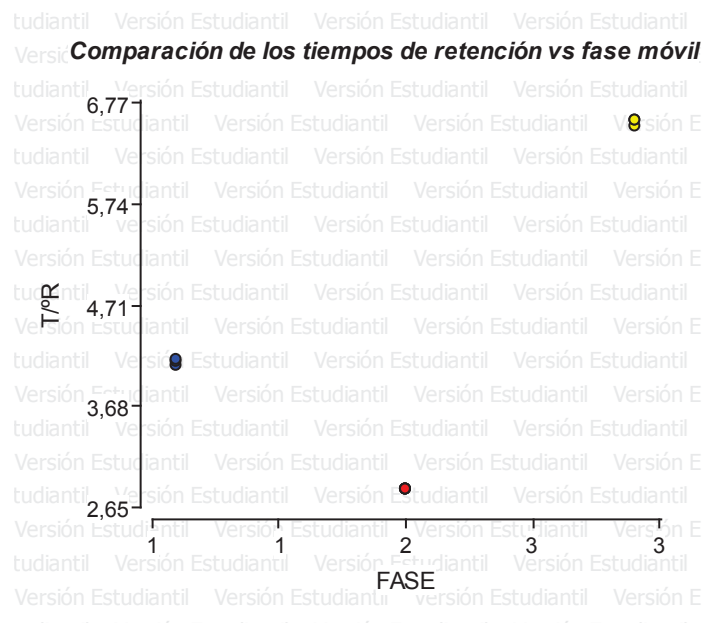


Figura 3.2: Tiempo de retención del estándar de CoQ10 2uM según las fases móviles probadas.

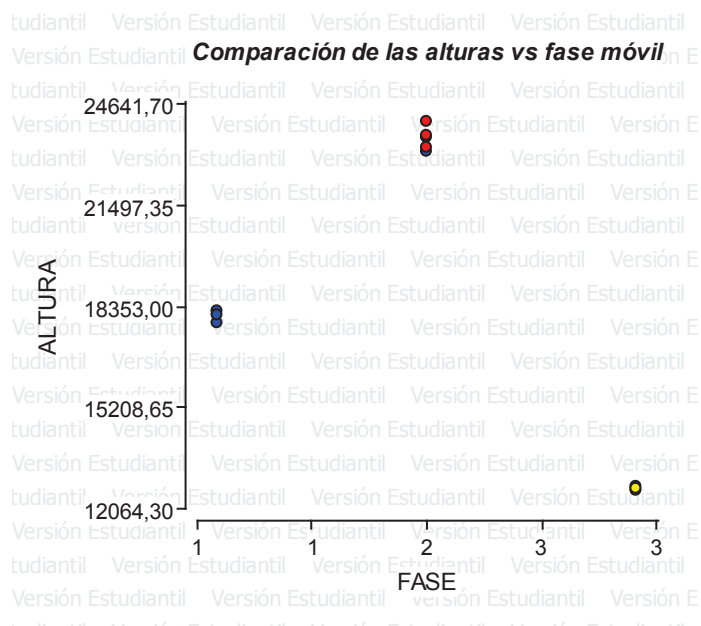


Figura 3.3: Altura del pico cromatográfico del estándar de CoQ10 2uM según las fases móviles probadas.

Por lo que se escogió como fase móvil óptima la fase 2: metanol 60%/1-propanol 40%, ya que como se observa en las Figuras 3.1, 3.2 y 3.3, así como en la Tabla 3.1, es la que presenta las mejores características en los tres criterios considerados, siendo la que proporciona una mayor altura al pico cromatográfico, el menor tiempo de corrida, así como la mayor área, aunque en ésta última característica no tuvo una diferencia significativa con la fase 1.

### 3.1.2 Velocidad de flujo.

De los tres flujos probados con el estándar 2uM de coenzima Q10 (0,3ml/min, 0,4ml/min y 0,5ml/min), se obtuvieron los siguientes resultados:



Tabla 3.2: Respuesta cromatográfica del estándar 2uM de CoQ10 a las tres velocidades de flujo de prueba.

°T/R (minutos)	ÁREA (unidades AU)	ALTURA (unidades AU)	FLUJO (ml/min)
3,75	418357	24419	0,3
3,76	419074	25135	0,3
3,76	420555	24451	0,3
2,84	315582	23160	0,4
2,84	316290	23598	0,4
2,84	316345	23287	0,4
2,84	318437	24070	0,4
2,84	318066	23658	0,4
2,29	255801	22196	0,5
2,29	254987	22341	0,5
2,29	255382	22403	0,5

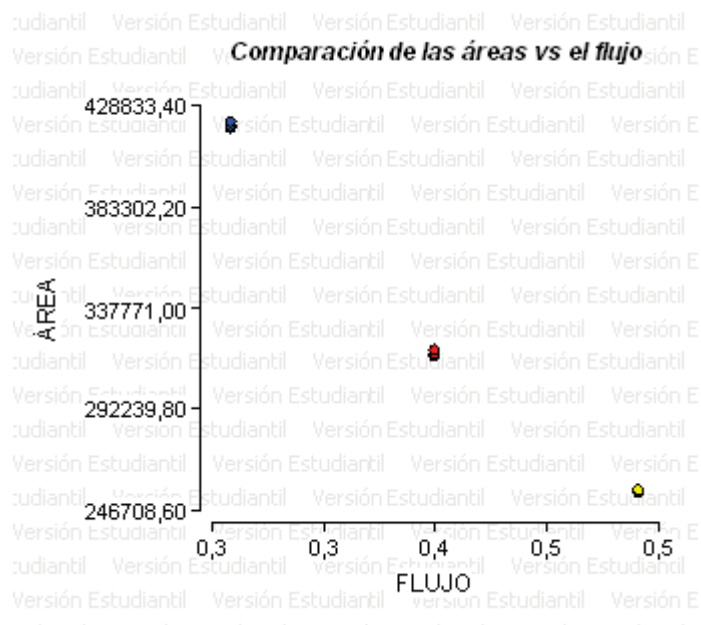


Figura 3.4: Áreas obtenidas del estándar de CoQ10 2uM según las velocidades de flujo probadas.

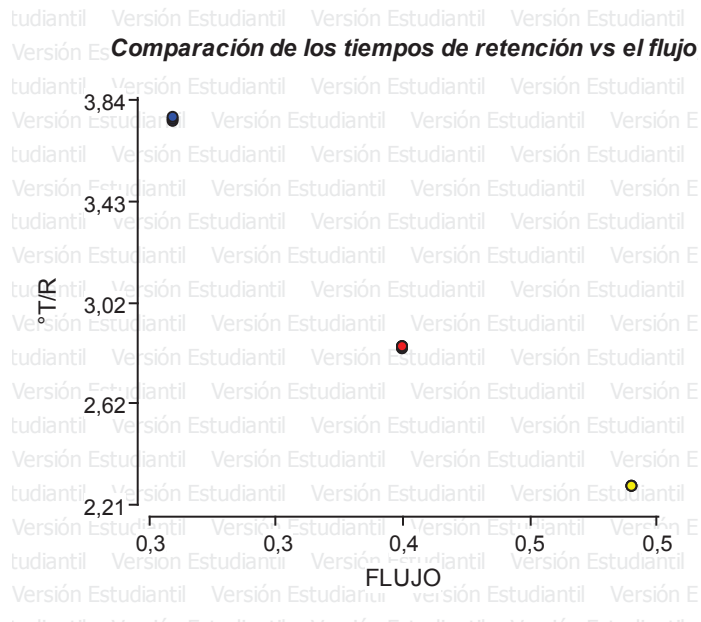


Figura 3.5: Tiempo de retención del estándar de CoQ10 2µM según las velocidades de flujo probadas.

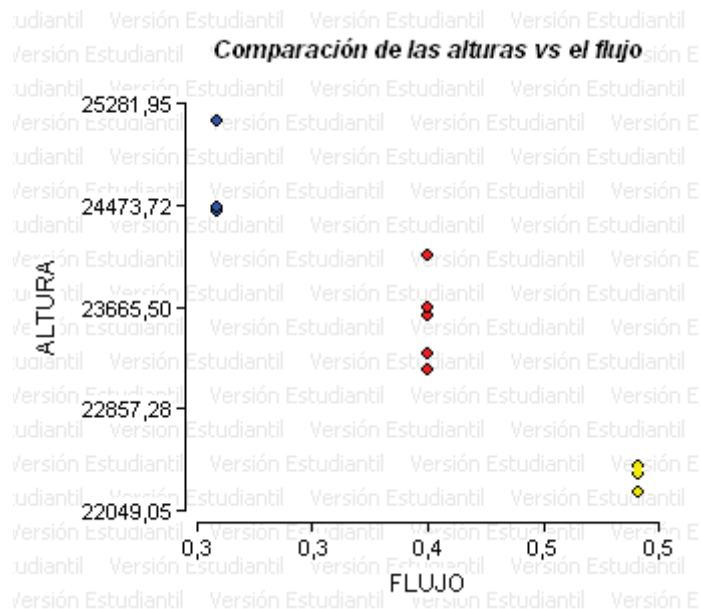


Figura 3.6: Altura del pico cromatográfico del estándar de CoQ10 2µM según las velocidades de flujo probadas.

Se escogió el flujo 0,4ml/min como el óptimo para la determinación de Q10 en plaquetas, ya que éste ofrece un área y altura satisfactorias a un tiempo de retención corto. No se escogió el flujo 0,3ml/min a pesar de presentar la mayor área y altura, dado que éste tenía el tiempo de corrida más largo de los evaluados, lo cual no es conveniente económicamente para la viabilidad del ensayo. Tampoco fue electo el flujo de 0,5ml/min pues, aunque tenía el menor tiempo de retención, recuperó la menor concentración y altura del estándar probado.

### **3.2 Protocolo óptimo estandarizado.**

Después de todas las modificaciones mencionadas en el Capítulo 2, literal 2.7.1, se obtuvo el siguiente protocolo óptimo de extracción y cuantificación de coenzima Q10 en plaquetas:

- Extraer 4,5 ml de sangre periférica en tubos citratados, de voluntarios sanos con 8 h de ayuno.
- Decantar dicha sangre hasta que la fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) corresponda aproximadamente al 20% del volumen de sangre total.
- Tomar una alícuota de 10 µl del PRP obtenido, para efectuar el recuento manual de plaquetas en la cámara de Neubauer.
- Tomar una alícuota de 800 µl de PRP y centrifugarla a 11000rpm durante 15 minutos.
- Descartar el sobrenadante (plasma pobre en plaquetas “PPP”). En este paso se puede optar por la determinación de CoQ10 en el día de extracción de la muestra o guardar el pellet de plaquetas a -55 °C para el posterior análisis de CoQ10.
- Adicionar 200 µl de 1-propanol frío al pellet y agitar la mezcla en vórtex a máxima velocidad durante 3 min.
- Centrifugar a 10000rpm por 10 minutos.
- Tomar la fase orgánica y evaporarla a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno.

- Reconstituir el residuo en un volumen final de 100 µl de la fase móvil metanol: 1-propanol relación 60:40.

Las condiciones cromatográficas para la cuantificación de las muestras fueron:

- Fase móvil metanol: 1-propanol 60:40.
- Flujo: 0,4 ml/min.
- Volumen de inyección 90 µl.
- Corrida isocrática.
- Temperatura de la muestra: 8°C ± 2.
- Temperatura de la columna: 25°C ± 5.
- Absorbancia: 275nm.

### 3.3 Parámetros de desempeño del método.

#### 3.3.1 Exactitud.

A partir de los resultados obtenidos de la aplicación de la metodología del literal 2.7.2.1, del capítulo de materiales y métodos, se procedió a calcular el porcentaje de recuperación del total de muestras corridas (exceptuando las de uso exclusivo del criterio de precisión), como una medida de veracidad de la medición de los resultados. Para lo que se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación (CV)} = \frac{[muestra \textit{espiqueada}] - [muestra \textit{normal}]}{[estándar \textit{añadido}]} * 100$$

La concentración del estándar de coenzima Q10 añadida en la muestra de la persona 1 fue de 1µmol/L y en la persona 2 fue de 0,75 µmol/L.

A continuación, los porcentajes de recuperación obtenidos:

Tabla 3.3: Comprobación de veracidad del método (exactitud).

IDENTIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN MUESTRA ESPIQUEADA	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN
PERSONA N. 1	0,746	1,741	92,991
	0,588	1,728	104,587
	0,7	1,722	93,761
	0,665	1,736	98,257
	0,667	1,739	98,349
	0,691	1,747	96,881
	0,646	1,74	100,367
	0,698	1,73	94,679
	0,675	1,714	95,321
	0,686	1,723	95,138
PERSONA N. 2	0,836	1,578	98,933
	0,797	1,514	95,600
	0,809	1,53	96,133
	0,807	1,532	96,667
	0,818	1,539	96,133
	0,829	1,554	96,667
	0,827	1,552	96,667
	0,832	1,556	96,533
	0,837	1,554	95,600
PROMEDIO	0,744947368	1,643631579	96,803
DESV. ESTÁNDAR	0,080461498	0,096789124	2,577
LIC			91,753
LSC			101,854

Nota: LSC (límite superior de control); LIC (límite inferior de control).

Como se observa en la Tabla 3.3, la veracidad del método fue adecuada, ya que se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio del principio activo del 96,8%, lo que cumple con el objetivo de validación planteado para este criterio que fue establecido en un valor igual o mayor al 90% de recuperación.

### 3.3.2 Precisión.

Con los datos obtenidos de la aplicación del diseño de la Tabla 2.1, mismos que se muestran a continuación en las Tablas 3.4 y 3.5, se procedió a calcular los estadísticos de prueba correspondientes a cada criterio de precisión del método.

Tabla 3.4: Determinación del criterio de repetibilidad.

REPETIBILIDAD				
ID. MUESTRA	CONCENTRACIÓN	NIVEL	DÍA	VARIANZA
PERSONA N. 1	0,75	medio	1	0,001676667
	0,59	medio	1	
	0,7	medio	1	
	0,67	medio	1	
	0,67	medio	1	
	0,69	medio	1	
	0,65	medio	1	
	0,7	medio	1	
	0,68	medio	1	
	0,69	medio	1	
BLANCOS	0,02	bajo	0	1,77778E-05
	0,02	bajo	0	
	0,02	bajo	0	
	0,02	bajo	0	
	0,01	bajo	0	
	0,02	bajo	0	
	0,02	bajo	0	
	0,02	bajo	0	
	0,01	bajo	0	
	0,02	bajo	0	
PERSONA N. 1 + STD CONOCIDO	1,741	alto	2	0,00010667
	1,728	alto	2	
	1,722	alto	2	
	1,736	alto	2	
	1,739	alto	2	
	1,747	alto	2	
	1,74	alto	2	
	1,73	alto	2	
	1,714	alto	2	
	1,723	alto	2	

Tabla 3.5: Determinación del criterio de reproducibilidad.

REPRODUCIBILIDAD				
ID. MUESTRA	CONCENTRACIÓN	NIVEL	DÍA	VARIANZA
PERSONA N. 2	0,836	medio	1	0,00020325
	0,797	medio	1	
	0,809	medio	1	
	0,807	medio	1	
	0,818	medio	1	
	0,829	medio	8	
	0,827	medio	8	
	0,832	medio	8	
	0,837	medio	8	
LÍM. DE CUANTIFICACIÓN	0,02	bajo	0	1,7778E-05
	0,02	bajo	0	
	0,02	bajo	0	
	0,02	bajo	0	
	0,01	bajo	0	
	0,02	bajo	7	
	0,02	bajo	7	
	0,02	bajo	7	
	0,01	bajo	7	
	0,02	bajo	7	
PERSONA N. 2 + STD CONOCIDO	1,578	alto	2	0,00035128
	1,514	alto	2	
	1,53	alto	2	
	1,532	alto	2	
	1,539	alto	2	
	1,554	alto	9	
	1,552	alto	9	
	1,556	alto	9	
	1,554	alto	9	

*Para la determinación de repetibilidad:*

Tabla 3.6: Prueba F para igualdad de varianzas (criterio de repetibilidad).

VARIABLE	GRUPO (1)	GRUPO (2)	n(1)	N (2)	VAR (1)	VAR (2)	F	P	PRUEBA
CONCEN.	{alto}	{bajo}	10	10	1,10E-04	4,30E-06	2,47E+01	0,0001	Bilateral
CONCEN.	{alto}	{medio}	10	10	1,10E-04	1,70E-03	0,06	0,0003	Bilateral
CONCEN.	{bajo}	{medio}	10	10	4,30E-06	1,70E-03	2,60E-03	<0,0001	Bilateral

Debido a que no existen diferencias significativas entre las varianzas de los grupos con nivel de concentración medio y alto, así como por la diferencia altamente significativa encontrada entre los niveles de concentración bajo y medio (Tabla 3.6), se establecieron dos rangos de aceptación o rechazo de los resultados del método corridos en condiciones de repetibilidad (mismo equipo, mismo analista, mismo laboratorio, período corto de tiempo), mismos que se detallan en la Tabla 3.8.

*Para la determinación de reproducibilidad:*

Tabla 3.7: Prueba F para igualdad de varianzas (criterio de reproducibilidad).

VARIABLE	GRUPO (1)	GRUPO (2)	N (1)	N (2)	VAR (1)	VAR (2)	F	P	PRUEBA
CONCEN.	{alto}	{bajo}	10	10	0,03	1,10E-06	23487,75	<0,0001	Bilateral
CONCEN.	{alto}	{medio}	10	10	0,03	0,03	0,97	0,969	Bilateral
COENCEN.	{bajo}	{medio}	10	10	1,10E-06	0,03	4,10E-05	<0,0001	Bilateral



En cuanto no se encuentran diferencias significativas entre las varianzas de los niveles de concentración medio y alto, y al contrario, existe una diferencia altamente significativa entre el nivel bajo y medio (Tabla 3.7), se establecieron dos rangos de aceptación o rechazo para los resultados que se obtengan de la aplicación del método, en condiciones de reproducibilidad (diferentes laboratorios, diferente analista en un mismo laboratorio, pero en un período largo de tiempo). Estos se detallan a continuación en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8: Rangos de aceptación del método.

	REPETIBILIDAD		REPRODUCIBILIDAD	
RANGOS DE ACEPTACION	0,004	0,02	0,002	0,037
	bajo	alto	bajo	Alto

Estos valores son adimensionales y tienen un nivel de confianza del 95%. Fueron calculados multiplicando el factor 1,96 por la desviación estándar promedio de cada grupo de concentración baja y alta, implicado en los criterios de precisión del método.

Para la aplicación de estos límites a una muestra, se debe obtener la diferencia absoluta de dos mediciones de las misma y ese resultado compararlo contra estos rangos.

### 3.3.3 Robustez.

Para la determinación de la robustez del método, se calcularon los límites superior (LSC) e inferior de control (LIC) al 95% de confianza, a partir del promedio del porcentaje de recuperación y la desviación estándar de las muestras de las personas N.1 y N.2, utilizadas para las pruebas de exactitud, precisión y robustez, mismas que se muestran en la Tabla 3.3.

Para el cálculo de mencionados límites se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$LSC = X + S * 1,96$$

$$LIC = X - S * 1,96$$

Donde, “X” es el promedio de los porcentajes de recuperación y “S” representa de desviación estándar de dichas recuperaciones.

El rango de robustez del método se estableció entre el 91,75 y el 101,85 por ciento de recuperación, lo que cumple con el objetivo de validación establecido para este parámetro que fue del 90 al 110 por ciento.

### 3.3.4 Sensibilidad del método: límite de detección y cuantificación.

Las concentraciones obtenidas de los 10 blancos de muestra preparados según la metodología del literal 2.7.2.2 de esta tesis, se muestran a continuación:

Tabla 3.9: Concentración de los blancos de muestra.

IDENTIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN
BLANCOS DE MUESTRA	0,018
	0,016
	0,018
	0,017
	0,015
	0,016
	0,016
	0,022
	0,015
	0,018
PROMEDIO	0,017
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,002

De donde, mediante la aplicación de las fórmulas:  $LD = X_{\text{blancos}} + 3S_{\text{blancos}}$ ;  $LC = X_{\text{blancos}} + 10S_{\text{blancos}}$ , se obtuvieron los siguientes límites:

Tabla 3.10: Límite de detección y límite de cuantificación del método.

CRITERIO	CONCENTRACIÓN (umol/L)
LD	0,023+/-0,002
LC	0,038+/-0,002

A partir de estos resultados, se corrieron además, 10 repeticiones al nivel de concentración de cada límite para evaluar su comportamiento, obteniendo los siguientes datos:

Tabla 3.11: Comportamiento de estándares preparados al límite de detección y cuantificación del método.

CRITERIO	LÍMITE DE DETECCIÓN	RANGO LD	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	RANGO LC
CONCENTRACIÓN (umol/L)	0,027	0,002	0,040	0,002
	0,025		0,038	
	0,025	0,002	0,040	0,002
	0,023		0,038	
	0,026	0,002	0,038	0,001
	0,024		0,039	
	0,027	0,002	0,039	0,001
	0,025		0,038	
	0,026	0,001	0,040	0,001
	0,027		0,039	

Como se observa en la Tabla 3.11, el rango más alto del límite de detección fue de 0,002, lo que cumple con el límite para muestras de concentración baja, corridas en condiciones de repetibilidad que es de 0,004. Asimismo, el rango más alto del límite de cuantificación (0,002), mismo que fue corrido en condiciones de reproducibilidad, cumple con el valor indicado para rangos de concentración baja dentro de este criterio, que es de 0,002.

Por lo que, se puede decir que el método aún a niveles muy bajos de concentración se comporta con precisión adecuada en la medición de los resultados.

### 3.3.5 Linealidad.

La respuesta cromatográfica de las cuatro curvas de calibración corridas en condiciones de reproducibilidad, para evaluar la linealidad del método, se muestra a continuación en la Tabla 3.12 y en la Figura 3.7.

Tabla 3.12: Curvas de calibración del método.

ID. CURVA	CONCENTRACIÓN (umol/L)	ÁREA	ECUACIÓN	R <sup>2</sup>
1	0,1	15127	$y = 189986x - 4296,4$	0,9999
	0,5	90261		
	0,75	137817		
	1	184656		
	1,5	283384		
	2	374396		
2	0,1	14837	$y = 195476x - 8811,7$	0,9989
	0,5	88543		
	0,75	136326		
	1	178873		
	1,5	289226		
	2	382861		
3	0,1	15749	$y = 184156x - 5993,8$	0,9953
	0,5	89785		
	0,75	132248		
	1	172965		
	1,5	256577		
	2	374026		
4	0,1	10629	$y = 182175x - 13644$	0,9976
	0,5	76261		
	0,75	122697		
	1	157171		
	1,5	263600		
	2	353502		

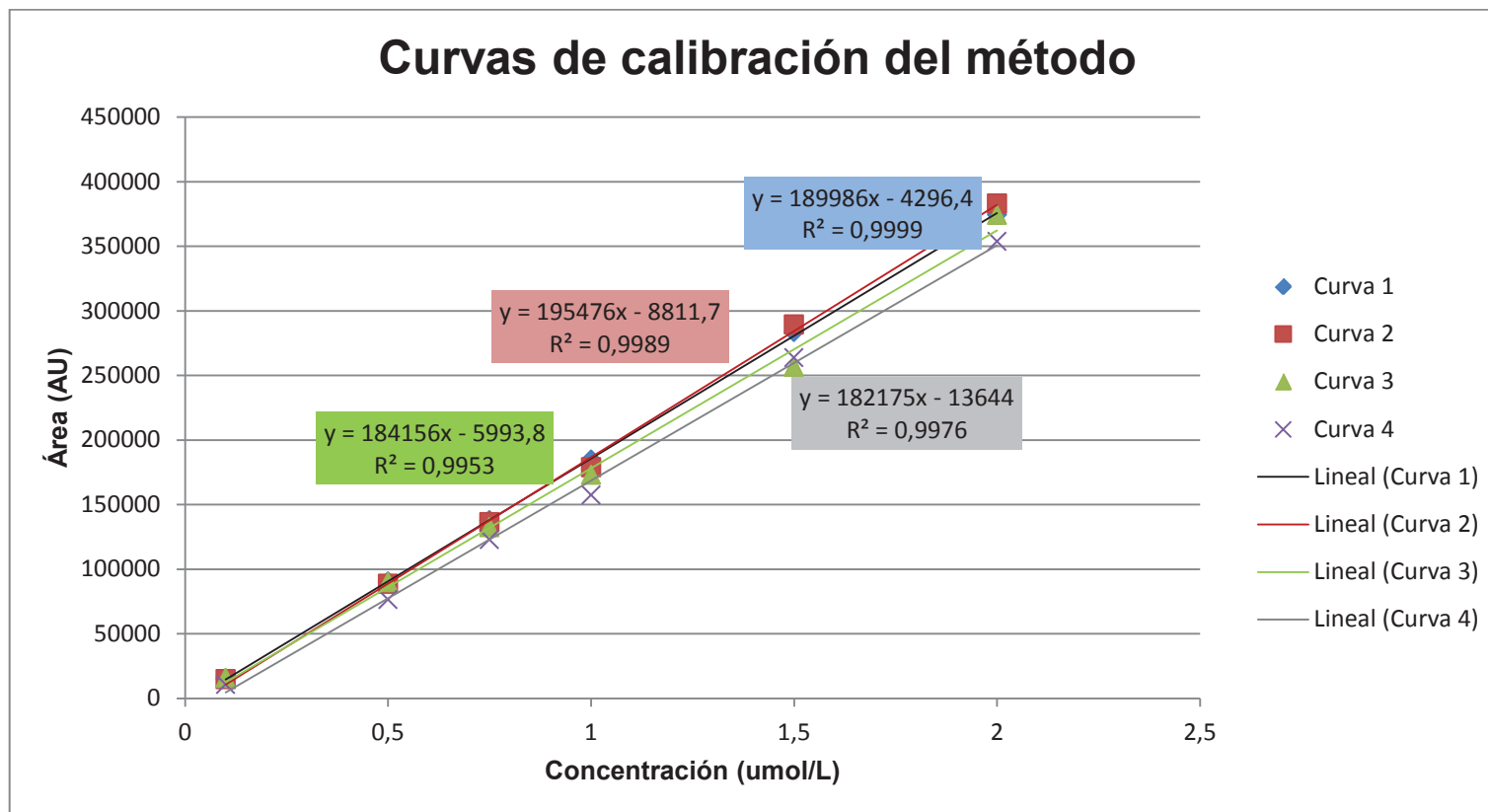


Figura 3.7: Respuesta cromatográfica de las curvas de calibración del método.

Como se puede observar en la Tabla 3.12 y en la Figura 3.7, las cuatro curvas de calibración probadas, mostraron un comportamiento muy similar, teniendo en todos los casos un coeficiente de correlación  $R^2$  mayor a 0,99, lo que implica que la respuesta del método es directamente proporcional a la concentración inyectada, por lo que, este método cumple con el objetivo de validación predicho para este parámetro, así como, con los criterios emitidos por las normas internacionales del Eurachem.

En cuanto a los límites de aceptación o rechazo de las curvas de calibración, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3.13: Límites de aceptación de las curvas de calibración del método.

	PROMEDIO	DESV STD	LIC	LSC
PENDIENTE	187948,4565	6014,769486	176159,5083	199737,4047
CORTE EJE Y	-8186,536719	4087,291072	-16197,62722	-175,4462174
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	0,998956385	0,000977813	0,997039872	1

### 3.3.6 Confirmación de identidad: selectividad/especificidad.

Los resultados de las corridas cromatográficas de los reactivos implicados en la preparación y elución de las muestras, se muestran a continuación en las Figuras 3.8, 3.9 y 3.10.

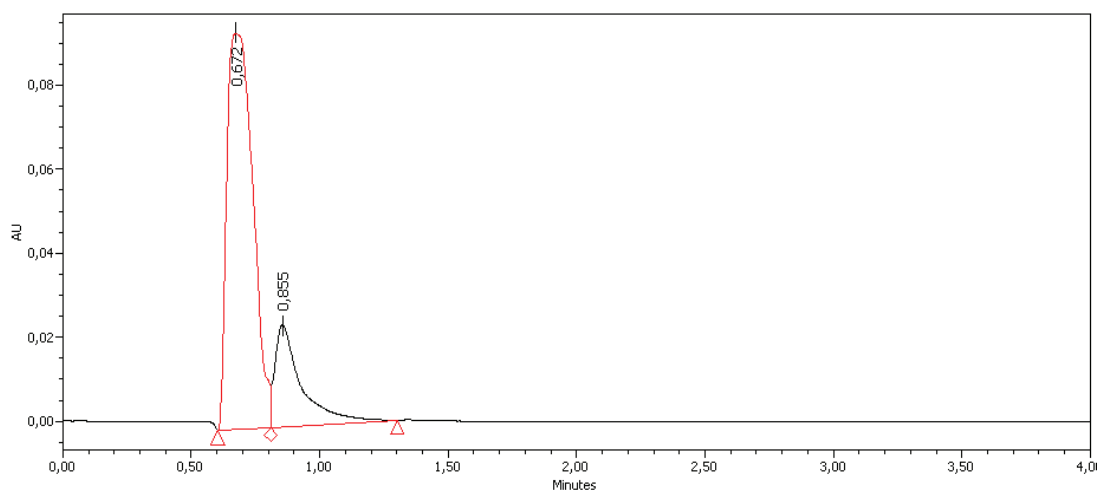


Figura 3.8: Cromatograma de la inyección de metanol grado HPLC.

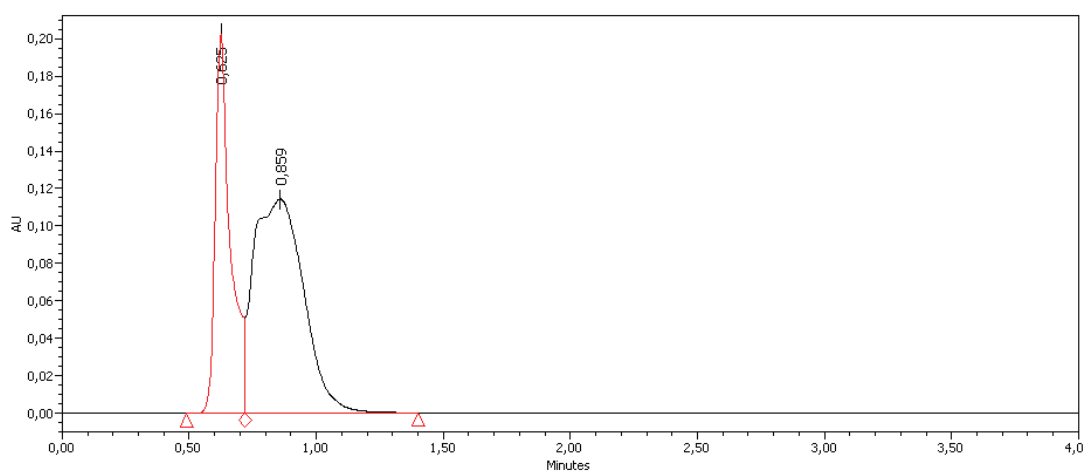


Figura 3.9: Cromatograma de la inyección de 1-propanol grado HPLC.

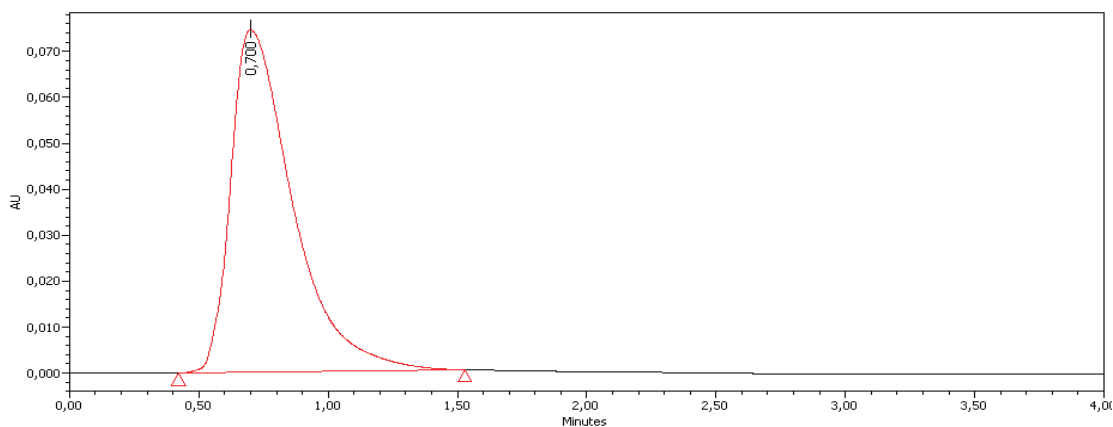


Figura 3.10: Cromatograma de la inyección de la fase móvil del método (metanol 60%: 1-propanol 40%).

Como se observa en las tres figuras precedentes (3.8, 3.9 y 3.10), al tiempo de retención del pico de interés, es decir, a los 2,8 minutos, no existe interferencia alguna, por lo que, la respuesta dada por el cromatógrafo a las soluciones inyectadas de coenzima Q10, será debida únicamente a dicho compuesto.

### 3.3.7 Incertidumbre.

Las desviaciones estándares e incertidumbres instrumentales usadas para el cálculo de la incertidumbre estándar del método, se detallan a continuación:

Tabla 3.14: Desviaciones estándares de las fuentes aleatorias de incertidumbre del método (Evaluación Tipo A).

CRITERIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Reproducibilidad	0,018742406
Repetibilidad	0,010327956
Exactitud	0,053768778
LD	0,001354006
LC	0,001024374
Rango	0,000977813
Linealidad	0,000977813



Dado que los certificados de calibración de los equipos usados para el desarrollo de esta tesis no estuvieron disponibles, así como, tampoco el certificado de pureza del estándar de coenzima Q10, se tomó en cuenta para las incertidumbres instrumentales, la incertidumbre asociada a la división de escala de cada equipo, y para la pureza del estándar, el valor normalizado de 0,5 de impureza, multiplicado por el peso molecular del mismo, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15: Incertidumbres asociadas a las fuentes sistemáticas de incertidumbre del método (Evaluación Tipo B).

MATERIAL	INCERTIDUMBRE	UNIDADES
Balanza	0,00001	ml
Micropipeta	0,0005	ml
Resolución balanza	0,00005	ml
Estándar CoQ10	0,057917294	ml

De donde, aplicando las fórmulas establecidas en el literal 2.7.2.5, del capítulo de materiales y métodos, se definió una incertidumbre estándar de 0,07 y una incertidumbre expandida de 0,14, lo que cumple con el objetivo de validación establecido para este criterio que consideró un valor menor o igual a 0,30.

### 3.4 Muestras.

La respuesta cromatográfica, así como otras características de las 35 muestras corridas por duplicado para evaluar el comportamiento global del método validado, se detallan a continuación en la siguiente tabla.

Tabla 3.16: Respuesta de las 35 muestras corridas con el método validado.

Nº	T/R	CONCEN TRACIÓN (umol /L)	No. PLA QUE TAS	CONCEN TRACIÓN (picomol/10 E9 plaquetas)	EDAD	GENE RO	RAN GO	LIC	LSC
1	2,746	1,144	720000	238,333	24	F	0,027	0	0,04
1	2,76	1,117	720000	232,708	24	F		0	0,04
2	2,79	0,734	1050000	152,917	23	F	0,046	0	0,04
2	2,812	0,78	1050000	162,500	23	F		0	0,04
3	2,785	0,546	1100000	113,750	20	F	0,023	0	0,04
3	2,765	0,523	1100000	108,958	20	F		0	0,04
4	2,762	0,665	790000	138,542	24	F	0,041	0	0,04
4	2,78	0,706	790000	147,083	24	F		0	0,04
5	2,717	0,976	820000	203,333	23	F	0,002	0	0,04
5	2,703	0,974	820000	202,917	23	F		0	0,04
8	2,719	0,63	690000	131,250	20	F	0,036	0	0,04
8	2,708	0,666	690000	138,750	20	F		0	0,04
9	2,708	0,751	610000	156,458	19	F	0,028	0	0,04
9	2,699	0,723	610000	150,625	19	F		0	0,04
10	2,75	0,521	910000	108,542	23	F	0,032	0	0,04
10	2,726	0,553	910000	115,208	23	F		0	0,04
13	2,742	0,758	710000	157,917	20	F	0,03	0	0,04
13	2,738	0,788	710000	164,167	20	F		0	0,04

Nº	T/R	CONCEN TRACIÓN (umol /L)	No. PLA QUE TAS	CONCEN TRACIÓN (picomol/10 E9 plaquetas)	EDAD	GENE RO	RAN GO	LIC	LSC
14	2,735	1,022	540000	212,917	20	F	0,026	0	0,04
14	2,715	1,048	540000	218,333	20	F		0	0,04
15	2,787	1,807	780000	376,458	18	M	0,04	0	0,04
15	2,748	1,847	780000	384,792	18	M		0	0,04
16	2,722	0,753	830000	156,875	20	M	0,023	0	0,04
16	2,73	0,776	830000	161,667	20	M		0	0,04
17	2,719	0,863	840000	179,792	22	M	0,032	0	0,04
17	2,747	0,831	840000	173,125	22	M		0	0,04
18	2,71	0,696	690000	145,000	23	M	0,021	0	0,04
18	2,723	0,675	690000	140,625	23	M		0	0,04
20	2,72	0,795	810000	165,625	23	M	0,072	0	0,04
20	2,727	0,723	810000	150,625	23	M		0	0,04
21	2,719	0,574	790000	119,583	20	M	0	0	0,04
21	2,715	0,574	790000	119,583	20	M		0	0,04
25	2,688	0,703	600000	146,561	25	M	0,058	0	0,04
25	2,697	0,762	600000	158,750	25	M		0	0,04
26	2,707	0,611	950000	127,292	23	F	0,037	0	0,04
26	2,717	0,648	950000	135,000	23	F		0	0,04
27	2,725	1,106	810000	230,417	19	F	0,073	0	0,04

Nº	T/R	CONCEN TRACIÓN (umol /L)	No. PLA QUE TAS	CONCEN TRACIÓN (picomol/10 E9 plaquetas)	EDAD	GENE RO	RAN GO	LIC	LSC
27	2,745	1,033	810000	215,208	19	F		0	0,04
28	2,698	0,694	650000	144,583	26	F	0,005	0	0,04
28	2,694	0,699	650000	145,625	26	F		0	0,04
29	2,733	0,874	540000	182,083	23	F	0,069	0	0,04
29	2,753	0,805	540000	167,708	23	F		0	0,04
30	2,763	0,622	780000	129,583	30	M	0,002	0	0,04
30	2,762	0,624	780000	130,000	30	M		0	0,04
31	2,782	0,107	290000	22,292	28	M	0,031	0	0,04
31	2,75	0,138	290000	28,750	28	M		0	0,04
32	2,757	0,977	880000	203,542	29	M	0,001	0	0,04
32	2,757	0,976	880000	203,333	29	M		0	0,04
33	2,778	0,11	480000	22,917	30	M	0,002	0	0,04
33	2,805	0,112	480000	23,333	30	M		0	0,04
34	2,748	0,715	530000	148,958	30	F	0,012	0	0,04
34	2,745	0,727	530000	151,458	30	F		0	0,04
35	2,732	0,485	750000	101,042	29	M	0,011	0	0,04
35	2,744	0,496	750000	103,333	29	M		0	0,04
36	2,758	0,312	270000	65,000	30	M	0,002	0	0,04
36	2,76	0,314	270000	65,417	30	M		0	0,04

Nº	T/R	CONCEN TRACIÓN (umol /L)	No. PLA QUE TAS	CONCEN TRACIÓN (picomol/10 E9 plaquetas)	EDAD	GENE RO	RAN GO	LIC	LSC
37	2,777	0,794	690000	165,417	30	M	0,002	0	0,04
37	2,787	0,792	690000	165,000	30	M		0	0,04
38	2,752	0,318	260000	66,250	25	M	0,003	0	0,04
38	2,757	0,321	260000	66,875	25	M		0	0,04
39	2,778	0,873	510000	181,875	24	M	0,028	0	0,04
39	2,764	0,901	510000	187,708	24	M		0	0,04
40	2,768	0,146	1040000	30,417	23	M	0,016	0	0,04
40	2,768	0,13	1040000	27,083	23	M		0	0,04
41	2,763	0,593	680000	123,542	26	M	0,004	0	0,04
41	2,758	0,589	680000	122,708	26	M		0	0,04
42	2,745	0,28	530000	58,333	27	F	0,008	0	0,04
42	2,747	0,272	530000	56,667	27	F		0	0,04
43	2,752	0,725	420000	151,042	26	F	0,027	0	0,04
43	2,763	0,698	420000	145,417	26	F		0	0,04
PROM.	2,744	0,694 59	695428,6	144,706817	24,14				
DSV. STD.	0,028	0,322 07	207348,2	67,0970383	3,661				

A partir de estos datos, con el fin de buscar alguna correlación entre la edad, género o número de plaquetas de los individuos analizados y la concentración de Q10 intracelular de los mismos, se realizaron los siguientes análisis de correlación mostrados en las Figuras 3.11, 3.12 y 3.13.

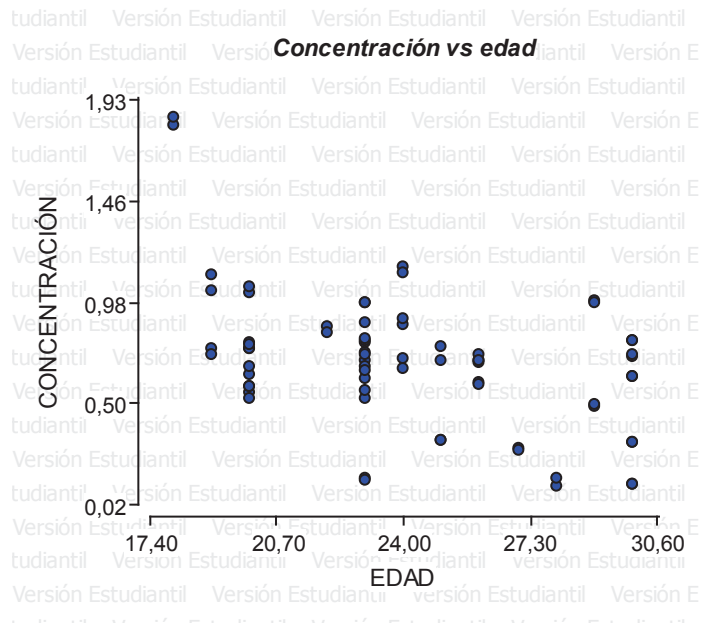


Figura 3.11: Relación entre la edad y la concentración de CoQ10 en plaquetas.

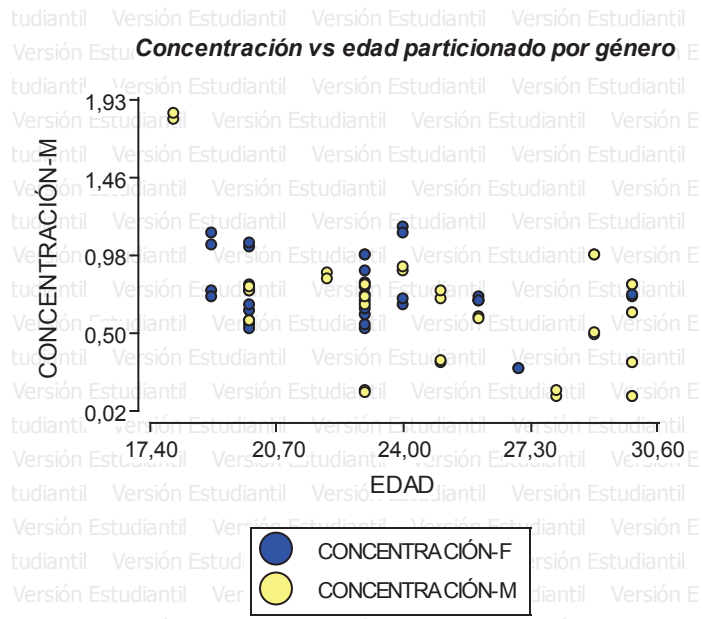


Figura 3.12: Relación entre el género y la concentración de CoQ10 en plaquetas.

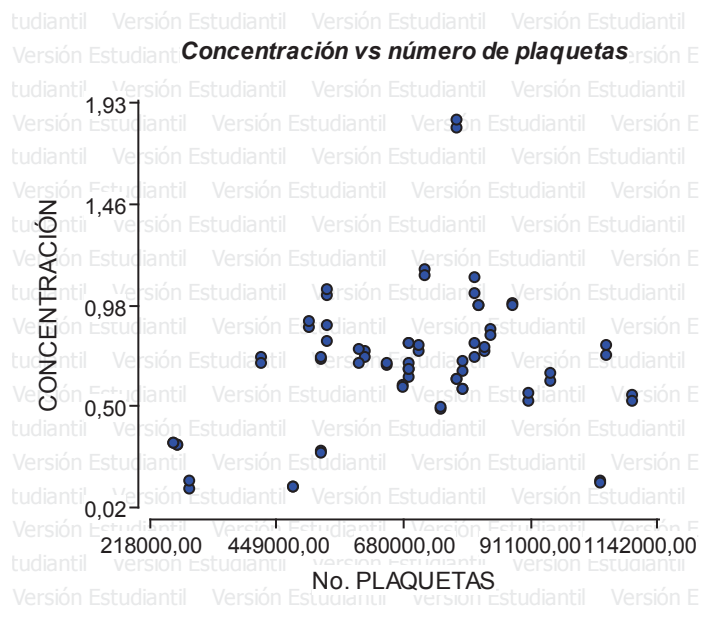


Figura 3.13: Relación entre el número de plaquetas y la concentración de CoQ10 en plaquetas.

De lo observado en las figuras anteriores (3.11, 3.12 y 3.13), se puede concluir que no existe una relación significativa entre la concentración de CoQ10 de los sujetos analizados y la edad, género o número de plaquetas de los mismos.

Por otro lado, de la Tabla 3.16 se obtuvieron las siguientes puntualizaciones:

- La concentración promedio de la coenzima Q10 en la población analizada fue de 0,69umol/L.
- La desviación estándar de las concentraciones medidas fue igual a 0,32.
- La concentración mínima y máxima medida en la población fue: 0,11 y 1,85umol/L, respectivamente.

Asimismo, al inferir estos datos utilizando una prueba T bilateral al 95% de confianza, se estableció como límite inferior una concentración de 0,62umol/L y como límite superior una concentración de 0,77umol/L, conservándose la misma media y desviación estándar de las muestras analizadas.

Finalmente, para evaluar el comportamiento del método con estas muestras, según los límites de precisión establecidos para condiciones de reproducibilidad, se realizó la siguiente carta de control, misma que se muestra a continuación en la Figura 3.14.



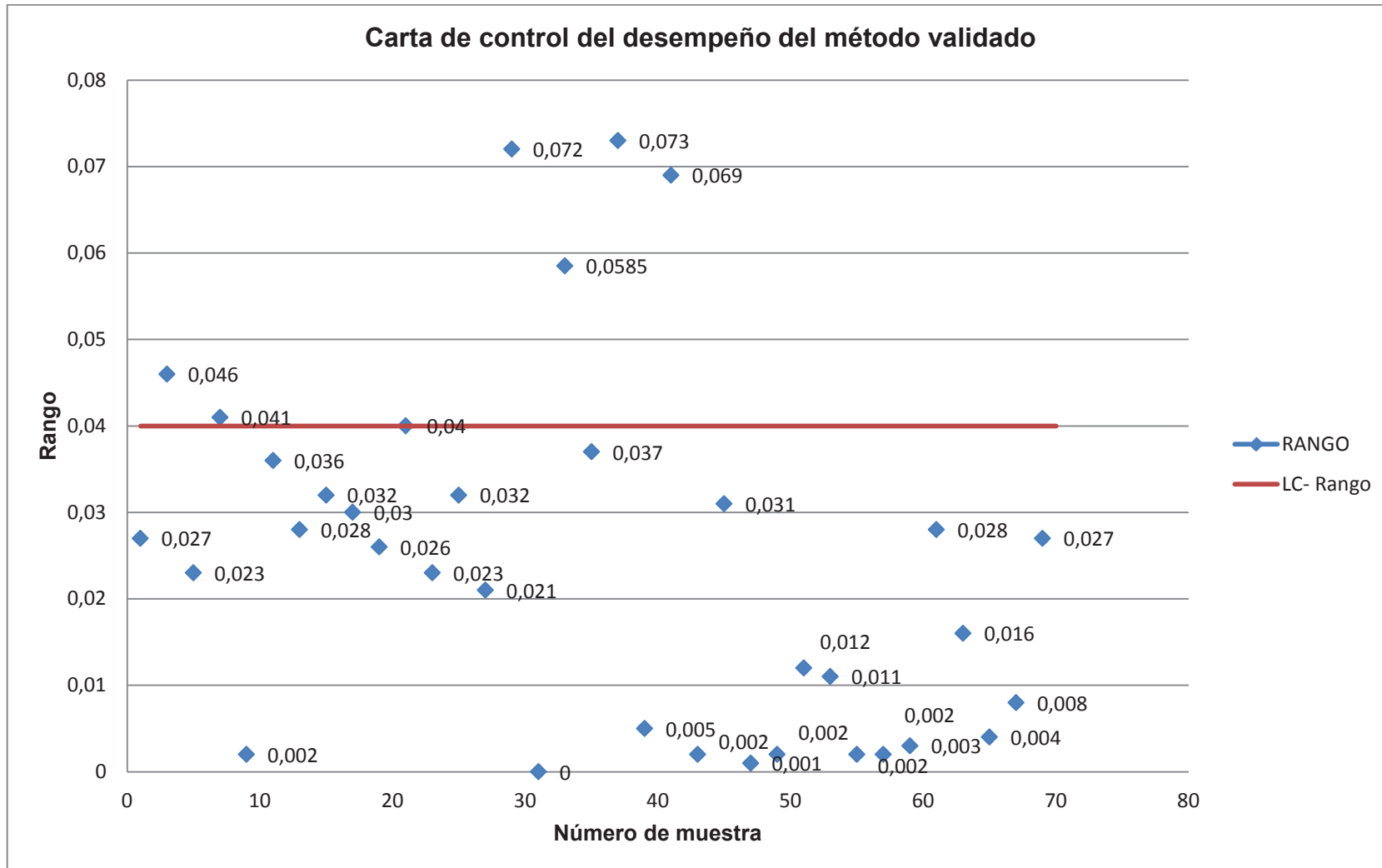


Figura 3.14: Carta de control del desempeño del método validado.

Como se puede observar en la Figura 3.14, la mayoría de las muestras corridas cumplen con el límite de reproducibilidad establecido por la validación del método. Sin embargo, existen cinco puntos con un comportamiento diferente al de la población, que por tanto, exceden dicho límite, por lo que, es necesario buscar las causas de esos “outliers” o valores atípicos.

## CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Estandarización del método.

La primera etapa en la validación de un método analítico es la *puesta a punto* u optimización de los parámetros de influencia del mismo. A menudo se confunden los términos estandarización y validación, pues ambos son complementarios y dependientes. Sin embargo, en este estudio se consideró como estandarización del método a la optimización de todos los factores influyentes tanto en el procesamiento de las muestras, como en su cuantificación.

Los parámetros con mayor efecto en la optimización del método fueron:

*La fase móvil.* Partiendo de que uno de los componentes de la fase móvil original fue reemplazado por su isómero (se usó 1-propanol en lugar de 2-propanol), este parámetro fue ampliamente probado para su utilización en el presente método, observándose las siguientes ventajas en relación al protocolo original: disminución del tiempo de retención, incremento de la respuesta cromatográfica de las muestras inyectadas, expresado como la altura y el área de las mismas y mayor compatibilidad con la matriz de muestra. Sin embargo, una desventaja hallada fue el tiempo de vida media de la solución patrón preparada con este nuevo solvente, mismo que fue de dos semanas solamente antes de presentar una degradación mayor al 20% de su contenido inicial.

*El flujo.* Como una medida de disminución del tiempo de retención de las muestras, así como para procurar un pico cromatográfico de altura adecuada en las mismas, se probaron varios flujos, siendo el más óptimo el de 0,4ml/min, ya que permite la elución rápida de las muestras, así como la formación de un pico de características deseables, es decir, con altura y área apropiadas. Lo que es muy importante, ya que uno de los parámetros que limita la expansión

y/o comercialización de servicios de análisis, es el costo de los mismos, por lo que, al obtener un método con tiempos cortos de corrida es más deseable su utilización para fines posteriores.

*El volumen de partida del plasma rico en plaquetas y el volumen de reconstitución del extracto seco.* Ambos parámetros fueron decisivos en la concentración de las muestras, dado que al aumentar la cantidad de plasma rico del que parte el procesamiento, se incrementa la disponibilidad de la CoQ10 a ser extraída. Asimismo, el disminuir el volumen de reconstitución del residuo seco, permite concentrar más la muestra, ya que el contenido de Q10 extraído se reparte en un volumen menor. Este proceso se desenvuelve en una relación matemática, donde a mayor volumen de partida y menor volumen de reconstitución, habrá una mayor concentración de la muestra.

Finalmente, *el volumen de inyección*, fue un parámetro clave para la visualización óptima del pico cromatográfico de la coenzima Q10 de las plaquetas en el cromatograma, ya que debido a que las cantidades medidas están en órdenes de picomol o micromol, el pico obtenido es muy pequeño, por lo que para incrementar su factor de respuesta, este parámetro fue incrementado a 90ul para su inyección.

#### **4.2 Validación del método.**

Los criterios evaluados en la validación del presente método fueron:

*Exactitud.* Este parámetro fue evaluado a través de la veracidad, obteniendo un resultado satisfactorio del 96,8% de recuperación de CoQ10 en una muestra, lo que cumple con los objetivos planteados en el presente proyecto de graduación, en la validación del método y está acorde con las normas internacionales del Eurachem, la ICH y la USP (ICH, 1996) (Eurachem, 2005) (USP - NF, 2008). Además, en comparación con la exactitud obtenida en

el protocolo guía (Contin, 2011), que fue del 89 al 95,3% de recuperación, éste método supera dicho nivel de exactitud aún en su límite superior.

*Precisión.* Los límites obtenidos para muestras de concentraciones bajas y altas, en condiciones de repetibilidad (0,004 - 0,02) y reproducibilidad (0,002 – 0,037), se mantuvieron dentro del rango de aceptación propuesto en los objetivos de la validación del método, mismo que fue establecido como cualquier valor menor o igual a una diferencia absoluta entre dos mediciones del mismo mesurando de 0,05. Por lo que el presente método tiene niveles de precisión aceptables y congruentes con los establecidos por el Eurachem y la USP (Eurachem, 2005) (USP - NF, 2008).

En relación con el protocolo guía, este método también tiene rangos de aceptación más exigentes, siendo los rangos establecidos por Contin de: 0,04 a 0,057 y de 0,043 a 0,063, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, respectivamente.

*Robustez.* Este criterio se estableció entre el 91,75 y el 101,85 por ciento de recuperación, lo que cumple con el objetivo de validación planteado para este parámetro, que fue del 90 al 110 por ciento, según lo recomendado por el Eurachem. Normalmente el límite superior de este rango se establece sobre el 100% de recuperación, ya que se considera que en el sistema de cuantificación de las muestras pueden existir elementos traza de corridas anteriores que estén en la capacidad de relacionarse con la muestra analizada, así como por los errores sistemáticos inherentes del aparato de medición usado.

*Sensibilidad.* Los dos criterios que determinaron la sensibilidad del presente método analítico fueron: límite de detección de  $0,023\mu\text{mol/L} \pm 0,002$  (5,31 picomol/1E9 plaquetas) y límite de cuantificación de  $0,038\mu\text{mol/L} \pm 0,002$  (8,04 picomol/1E9 plaquetas), que en relación con los límites obtenidos por

Contin (2011): límite de detección de 21 picomol/1E9 plaquetas y límite de cuantificación de 84 picomol/1E9 plaquetas, demuestran mucha mayor sensibilidad en las mediciones, por lo que éste método es capaz de medir concentraciones a niveles muy bajos, casi indetectables, con niveles de precisión y exactitud adecuados.

*Linealidad.* De acuerdo al coeficiente de correlación promedio de las cuatro curvas probadas en condiciones de reproducibilidad, mismo que fue de 0,998, se establece que las respuestas cromatográficas del método son perfectamente lineales a las concentraciones del principio activo, por lo que, pueden ser utilizadas con absoluta seguridad para cuantificar la coenzima Q10 de las plaquetas. Este coeficiente de correlación cumple con los límites establecidos por el Eurachem, la ICH y la USP (ICH, 1996) (Eurachem, 2005) (USP - NF, 2008).

*Confirmación de identidad: selectividad/especificidad.* Para garantizar que la respuesta cromatográfica se debe únicamente al compuesto analizado (Eurachem, 2005), se corrieron todos los componentes implicados en el procesamiento y cuantificación de la muestra, juntos y por separado, de lo que se observó que éstos no produjeron ninguna respuesta (pico cromatográfico) al tiempo de retención del analito de interés. Por lo que, se puede aseverar que éste método no presenta interferencias en sus mediciones.

*Incertidumbre.* La incertidumbre de medición de un método analítico, caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando (Ventura, 2008). El valor de la incertidumbre expandida es usualmente utilizado para expresar los resultados de un método con un nivel de confianza del 95% de que su valor verdadero se encuentre dentro de dicho nivel de incertidumbre (Schmid, 2000).

En este método la incertidumbre expandida fue de 0,14, lo que cumple con el límite establecido por el Eurachem, mismo que acepta una incertidumbre menor o igual a 0,30.

#### **4.3 Muestras.**

En este estudio, no se encontraron correlaciones significativas entre la edad, género o número de plaquetas de los individuos analizados con la concentración intracelular de coenzima Q10 de los mismos, por lo que, mayores experimentaciones serán necesarias para ratificar o negar dichas observaciones.

En cuanto a la carta de control establecida para evaluar el desempeño del método validado con las 35 muestras de individuos ecuatorianos sanos con edades de 18 a 30 años de edad, se puede decir, que aunque la mayor parte de muestras cumplieron con el límite de reproducibilidad (0,04), existieron 5 muestras atípicas que no siguieron este comportamiento, por lo que excedieron el límite anteriormente mencionado. Estas muestras anómalas según Grubbs (1969), pudieron deberse a un mal funcionamiento transitorio del aparato de medición, cambios en el comportamiento del sistema, el error humano o errores sistemáticos del instrumento. Más debido a la experiencia, se concluye que ésta variación se debió a la falta de estabilización de la botella dosificadora de 1-propanol, luego de aumentar su contenido.

## **CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES**

Se estandarizó y validó un protocolo de medición de coenzima Q10 en plaquetas, mediante la metodología de HPLC.

Se estableció que no existieron interferencias de otros compuestos en la medición del analito, mediante esta metodología.

Se demostró que los resultados de la prueba son directamente proporcionales a la concentración del principio activo, garantizando la capacidad del método para obtener resultados lineales.

Se comprobó que el método planteado es exacto y produce resultados consistentes.

Se evidenció que la fase móvil implementada brinda importantes ventajas sobre la fase móvil original.

El volumen de inyección, así como los volúmenes de plasma rico en plaquetas y de redisolución del residuo seco, determinaron la visualización óptima del pico de coenzima Q10 proveniente de las plaquetas, en los cromatogramas.

La exactitud, precisión, linealidad, y sensibilidad del presente método, presentaron mejores resultados que los obtenidos en el protocolo propuesto por Contin (2011).



La robustez e incertidumbre del método cumplieron con la normativa internacional definida por el Eurachem.

La concentración promedio de la coenzima Q10 intracelular en la población analizada fue de 0,69 $\mu$ mol/L.

## CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

Con los límites de calidad establecidos a partir de la validación del presente método, mismos que se muestran en el Anexo 1, se deben crear estrategias de verificación del control del método a corto plazo, como la carta de control presentada en la Figura 3.14, así como a largo plazo, por ejemplo, a través de planes anuales de intercomparación, para comprobar que la exactitud y precisión del método siguen estando bajo control.

Adicionalmente, se deben implementar medidas sistemáticas para el tratamiento de las muestras atípicas o fuera de control.

Para la validación de métodos analíticos es necesaria la utilización de instrumentos calibrados y materiales de referencia certificados.

Es recomendable ampliar este estudio con una población representativa del Ecuador para establecer una línea base de la concentración intracelular de la coenzima Q10 en adultos sanos, lo que permitirá a futuro diagnosticar anomalías relacionadas con la deficiencia de esta coenzima, así como verificar los niveles de absorción de la Q10 exógena en los tejidos de interés médico.

## CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alleva, R. T. (1995). The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfraction. *Proc Natl Acad Sci*, 92:9388-9391.
- Asensio Ramos M, H. B. (2009). Food analysis: A continuous challenge for miniaturized separation techniques. *J Sep Sci*, 32(24): 3764-800.
- Barshop B, G. J. (2007). Analysis of coenzyme Q in human blood and tissues. *Mitochondrion* S7, S89-S93.
- Beal, M. (1999). Coenzyme Q10 administration and its potential for treatment of neurodegenerative diseases. *Biofactors*. 9, 261 - 266.
- Bedoya, F. (2009). Homologación de métodos de análisis fisicoquímico empleados en Postobón S.A. para materias primas y producto terminado, y validación del método para la determinación de grados brix. Medellín: Universidad de Antioquía.
- Bhagavan, H. a. (2006). Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radical Research* 40(5), 445–453.
- Brandt U, O. J. (1997). Role of deprotonation events in ubihydroquinone: cytochrome c oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria. *Biochemistry*.36, 11234–40.
- Brandt, U. (1999). Proton translocation in the respiratory chain involving ubiquinone—a hypothetical semiquinone switch mechanism for complex I. *Biofactors*, 9:95–102.
- Brandt, U. (2000). Exploring the ubiquinone binding sites of proton translocating enzymes of the respiratory chain. Second Conference of the International Coenzyme Q10 association. (págs. 1-3). Frankfurt, Germany: Institut for Biochemie I, Frankfurt.

- Carson, P. D. (1990). Good laboratory and clinical practices. Oxford: Heinemann Professional Publishing Ltd.
- Chung Chow Chan, H. L.-M. (2004). Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Contin, M. D. (2011). Sistema cromatográfico miniaturizado para la determinación de coenzima Q10 en plasma, músculo y plaquetas. cta bioquím. clín. latinoam. vol.45 no.2, 1-2.
- Craft, N. T. (2005). Assessment of coenzyme Q10 bioavailability using a coupled in vitro digestion/Caco-2 human intestinal cell model. FASEB J, 19:A449.
- Crane, F. (2000). Biochemical functions of coenzyme Q10. J Am Coll Nutr, 20 (6): 591-8.
- Crane, F. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. J Am Coll Nutr, 20: 591–598.
- Dallner, G. B. (2003). Regulation of coenzyme Q biosynthesis and breakdown. Biofactors, 18:11-22.
- Duncan AJ, H. S. (2005). Determination of coenzyme Q10 status in blood mononuclear cells, skeletal muscle, and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme Q10 as an internal standard. Clin Chem.51, 2380–2382.

- Dux, J. P. (1986). Handbook of Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Ecos de Congresos. (2000). La coenzima Q10, su función en la cadena de transporte de electrones y su implicancia en las enfermedades neurodegenerativas. "Second Conference of the International Coenzyme Q10 Association", (págs. 1-3). Frankfurt, Alemania.
- Ellison, S. W. (1996). Measurement Uncertainty: the Key to the Use of Recovery Factors? from "The Use of Recovery Factors in Trace Analysis". Parkany, M., pub. Royal Society of Chemistry.
- Elmberger, P. K. (1989). Discharge of newly-synthesized dolichol and ubiquinone with lipoproteins to rat liver perfusate and to the bile. *Lipids*, 24:919–930.
- EPA, U. (1995). Guidance for methods development and methods validation for the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) Program. Washington, D.C.
- Ernster, L. D. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*, 1271:195–204.
- Ernster, L. D. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*.1271, 195–204.
- Eurachem. (2005). Métodos analíticos adecuados a su propósito. México: Eurachem.

- FDA, U. (2000). Guidance for Industry (draft) Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls and Documentation. E.E.U.U.: U.S.FDA.
- Folkers K., L. P. (1990). Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans. Proc. Natl. Acad Sci. 87, 8931-8934.
- Ghirlanda G., O. A. (1993). Evidence of Plasma CoQ10 - Lowering Effect by HMG-CoA Reductase Inhibitors: A double blind , placebo-controlled study. Clin. Pharmacol., J. (33). 3, 226-229.
- Gómez, H. (15 de Mayo de 2009). Bios. Recuperado el 2 de Julio de 2012, de <http://benitobios.blogspot.com/2009/05/cadena-respiratoria-y-fosforilacion.html>
- Greenberg, S. F. (1990). Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease. J Clin Pharmacol, 30 : 596-608.
- Grubbs, F. (1969). Procedimientos para la detección de observaciones atípicas en las muestras. Technometrics, 11, 1-21.
- Hargreaves, I., Lane, A., & Sleiman, P. (2008). The coenzyme Q10 status of the brain regions of Parkinson's disease patients. Neurosci Lett., 447: 17–19.
- Harris, D. (2001). Análisis químico cuantitativo. Barcelona: Reverté S.A.

- Hernández, L. a. (2002). Introducción al análisis instrumental. Barcelona: Ariel Ciencia.
- Hoppe, U. B. (1999). Coenzyme Q, a cutaneous antioxidant and energizer. *Biofactors*, 9:371–378.
- Hospital Sant Joan de Déu - Universidad de Barcelona. (2000). Defectos de la síntesis de coenzima Q10. Defectos de la síntesis de coenzima Q10 (págs. 1-2). Barcelona-España: Unidad de seguimiento de la PKU y otros trastornos metabólicos.
- ICH. (1996). International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures. Geneva.
- INEC, I. N. (2010). Principales causas de mortalidad general del año 2010. Anuario de Estadísticas vitales: Nacimientos y defunciones. Ecuador, 2010.
- ISO/TAG4/WG3. (1993). Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. New York: ISO/TAG4/WG3.
- IUPAC. (1974). Recomendations on Nomenclature for Chromatography. *Pure Appl. Chem*, 37:447.
- Kagan, V. N. (1996). Coenzyme Q. Its rol in scavenging and generation of radicals in membranes. NY-USA: Cardenas E, Packer L.

- Kaltschmidt, B. S. (1999). Activation of NFκB by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal*, 1:129–144.
- Katayama, K. F. (1972). Studies on the lymphatic absorption of. *Studies on the lymphatic absorption of*, 250:2585–2592.
- Kooncumchoo, P., Sharma, S., Porter, J., Govitrapong, P., & Ebadi, M. (2006). Coenzyme Q(10) provides neuroprotection in iron-induced apoptosis in dopaminergic neurons. *J. Mol. Neuroscience*, 28: 125–141.
- Langsjoen, P. H. (1999). Overview of the use of CoQ10 in cardiovascular disease. *BioFactors*. 9, 273–284.
- Lenaz, G. (2001). A critical appraisal of mitochondrial coenzyme Q pool. *FEBS Letters*, 509:151-155.
- Littarru G.P., L. S. (1991). Metabolic and diagnostic implications of blood CoQ10 levels. *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*, vol. 6., 167-178.
- Loro, J. (2001). *Manual de Cromatografía*. Canarias: Gobierno de Canarias. Dirección General de Universidades e Investigación.
- Mancuso, M., Coppede, F., Migliore, L., Siciliano, G., & Murri, L. (2006). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis*, 10: 59–73.



- Mancuso, M., Coppede, F., Migliore, L., Siciliano, G., & Murri, L. (2006). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis*, 10: 59–73.
- Matthews R, Y. L. (1998). Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentration and exerts neuroprotective effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 8892-7.
- Methods, P. A. (1998). Manual on policies and procedures. Arlington VA 22201-3301, USA: AOAC International.
- Meyer, V. (1997). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. England: Other Wiley.
- Miles, M. H. (2002). Bioequivalence of coenzyme Q10 from OTC supplements. *Nutr. Res.*, 22: 919-929.
- Miles, M. V. (2007). The uptake and distribution of coenzyme Q10. *Mitochondrion Res.* 7, 72-77.
- Miles, M. V. (2008). Validation and application of an HPLC-EC method for analysis of coenzyme Q10 in blood platelets. *Biomedical Chromatography*. 22, 1403–1408.
- Mohr, D. B. (1992). Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1126(3):247-54.

- Morad, M. S. (2000). Redox regulation of cardiac muscle calcium signaling. *Antioxid Redox Signal*, 2:65–71.
- Moreira, P., Santos, M., Sena, C., Nunes, E., Seica, R., & Oliveira, C. (2005). CoQ10 therapy attenuates amyloid beta-peptide toxicity in brain mitochondria isolated from aged diabetic rats. *Exp. Neurol*, 196: 112–119.
- Mortensen SA. (1993). Perspectives on therapy of cardiovascular diseases with coenzyme Q10 (ubiquinone). *Clin Invest*, 71 : 116-3.
- Munkholm, H. H. (1999). Coenzyme Q10 treatment in serious heart failure. *BioFactors* 9, 285–289.
- Okun JG, L. P. (1999). Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase). *J Biol Chem*. 274, 2625– 30.
- Organismo de Acreditación Ecuatoriano - OAE. (2005). Criterios generales. Acreditación de laboratorios de ensayo y calibración. Norma NTE INEN ISO/IEC 17025 . Quito.
- Overvad, K. D. (1999). Coenzyme Q10 in health and disease. *Eur J Clin Nutr*, 53:764–770.
- Palamakula, A. S. (2005). Regional permeability of coenzyme Q10 in isolated rat gastrointestinal tracts. *Pharmazie*, 60: 212-214.

- Poon, W. D. (1997). Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast coq mutants. *Mol Aspect Med*, 18(S):121–128, 1997.
- Quattrochi, O. D. (1992). *Introducción a la HPLC*. Argentina: Artes Gráficas Farro S.A.
- Rouessac, F. a. (2003). *Análisis químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas*. España: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Schmid, W. L. (2000). *Guía para estimar la incertidumbre de medición*. Centro Nacional de Metrología, División de Óptica y Radiometría, 2-4.
- Shults C, O. D. (2002). Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease. *Arch Neurol*, 59: 1541-50.
- Steele PE, T. P. (2004). Clinical laboratory monitoring of coenzyme Q10 use in neurologic and muscular diseases. *Am J Clin Pathol*. 121, 113–120.
- Storch A, J. W., & Group., G. C. (2007). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial on symptomatic effects of coenzyme Q(10) in Parkinson disease. *Arch Neurol.*, 64(7):938-44.
- Takahashi, T. O. (1996). Characterization of NADPH dependent ubiquinone reductase activity in rat liver cytosol. *J Biochem*, 119:256–263.

- Tomono, Y. H. (1986). Pharmacokinetic study of deuterium-labelled coenzyme Q10 in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 24: 536-541.
- Traber, M. L. (1992). Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. *Lipids*, 27:657–663.
- Turunen, M. S. (1999). Induction of endogenous coenzyme Q biosynthesis by administration of peroxisomal inducers. *Biofactors*, 9:131–140.
- USP - NF. (2008). Chapter <1225> – Validation of Compendial Methods. En U. NF, USP 32. Spanish Edition. (págs. 233-254). EEUU: USP Editors.
- Ventura, G. L. (2008). Cálculo de la incertidumbre de la medición. México: Centro de Salud Pública.
- Villalba, J. N. (2000). Plasma membrane redox system in the control of stress induced apoptosis. *Antioxid Redox Signal*, 2:213–230.
- Wadsworth, T., Bishop, J., Pappu, A., Woltjer, R., & Quinn, J. (2008). Evaluation of coenzyme Q as an antioxidant strategy for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis*, 14: 225–234.
- Weber C, B. A. (1997). The coenzyme Q10 content of the average Danish diet. *Int J Vitam Nutr Res*. 67, 123– 9.

- Weber, C. J. (1994). Effect of dietary coenzyme Q10 as an antioxidant in human plasma. *Mol Aspects Med.* 15, 97-102.
- Weis, M. M.-S. (1994). Bioavailability of four oral coenzyme Q10 formulations in healthy volunteers. *Mol. Aspects Med.*, 15: 273-280.
- Winkler-Stuck, K., Wiedemann, F., Wallesch, C., & Kunz, W. (2004). Effect of coenzyme Q10 on the mitochondrial function of skin fibroblasts from Parkinson patients. *J. Neurol. Sci*, 220: 41–48.
- Yokoyama H, L. D. (1996). Coenzyme Q10 protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect. *Surgery*, 120(2):189-96.
- Yu, C. Z.-P. (1999). Structure and reaction mechanisms of the multifunctional mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Biofactors*, 9:103–110.
- Zhang Y, A. F. (1995). Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats. *J Nutr.*125(3), 446-53.