



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: ESTUDIOS SOBRE LA
TRANSFERENCIA DE PARACETAMOL EN UN
MODELO AISLADO DE PLACENTA HUMANA**

Autor: Beatriz Fernández Rubio

Tutor: Sofía Ródenas de la Rocha

Convocatoria: JUNIO/2017

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
APAP	Paracetamol
APAP-Cys	Aductos de paracetamol-cisteína
APAP-Glth	Paracetamol-glutation
APAP-GLU	Sal sódica de 4-acetaminofenil- β -d-glucurónido
APAP-NAC	Paracetamol-N-acetilcisteína
APAP-OMe	Paracemol-metoxi
APAP-SULF	Sal potásica de 4-acetaminofén sulfato
GSH	Glutación
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
LC-MS/MS	Cromatografía líquida con tándem espectrómetro de masas
m/z	Relación de masa/carga
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona imina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPMI	Cultivo de Roswell Park Memorial Institute

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	2
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
2.1. Paracetamol: metabolismo y toxicidad	5
2.2. Sistema de perfusión ex-vivo de placenta humana.....	6
2.3. Antecedentes	7
3. OBJETIVOS	8
4. METODOLOGÍA.....	9
4.1. Reactivos utilizados en la fase móvil	9
4.2. Reactivos utilizados en pre-perfusión materna.....	10
4.3. Instrumentos	11
4.4. Método.....	11
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
5.1. Linealidad	12
5.2. Límites de detección	14
5.3. Precisión	14
6. CONCLUSIONES	17
7. BIBLIOGRAFÍA.....	18

1. RESUMEN

El paracetamol es uno de los analgésicos más utilizados por las embarazadas debido a que se considera que a dosis terapéuticas no provoca efectos adversos en la mujer ni en el feto. Sin embargo, nuevos estudios han demostrado que puede dar lugar a diversos problemas futuros en el feto por su posible capacidad de atravesar la placenta.

Así pues, a través de este trabajo práctico se ha intentado demostrar si el paracetamol y sus dos metabolitos principales (el 4-acetaminofenil- β -D-glucurónido y el 4-acetaminofenil sulfato) pueden atravesar la barrera placentaria y en qué grado.

Para ello se ha utilizado un sistema de perfusión placentario ex-vivo y cromatografía líquida con tándem espectrómetro de masas como método analítico de detección y cuantificación del paracetamol y sus dos metabolitos principales en perfusiones placentarias.

De esta forma, se analizaron diferentes concentraciones de los tres componentes diluidos en fase móvil y en pre-perfusiones maternas. A partir de los resultados obtenidos se desarrollaron curvas de calibrado con el fin de valorar la linealidad y se calcularon coeficientes de variación y límites de detección.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El paracetamol es el analgésico más comúnmente utilizado desde que comenzó su venta en Europa en la década de 1950¹. Respecto a su uso en mujeres embarazadas, este fármaco es usado como primer tratamiento en caso de fiebre y dolores. Sin embargo, distintos estudios sugieren que el paracetamol es capaz de atravesar la barrera placentaria libremente², hecho que se asocia con alteraciones endocrinas en los testículos del feto e incremento de riesgo de desarrollar asma en los niños posteriormente³.

Por tanto, es necesario conocer tanto las vías de metabolización del paracetamol como el mecanismo que utiliza para atravesar la barrera placentaria.

2.1. Paracetamol: metabolismo y toxicidad

El hígado es el órgano principal implicado en el metabolismo de paracetamol. Tras la ingesta de una dosis terapéutica (entre 600 mg y 1 g), el paracetamol se convierte principalmente en glucurónidos (52-57% de los metabolitos urinarios) y sulfatos (30-44%) conjugados, farmacológicamente inactivos, mientras que una fracción menor se oxida a un metabolito reactivo (5-10%) denominado NAPQI (N-acetil-p-benzoquinona imina). Menos del 5% del paracetamol se excreta sin cambios. El producto NAPQI es altamente reactivo y es el principal responsable de la hepatotoxicidad inducida por el paracetamol. La detoxificación de NAPQI se produce a través de su unión al grupo sulfhidrilo del glutatión (GSH), que se excreta en la orina como cisteína y conjugados del ácido mercaptúrico.

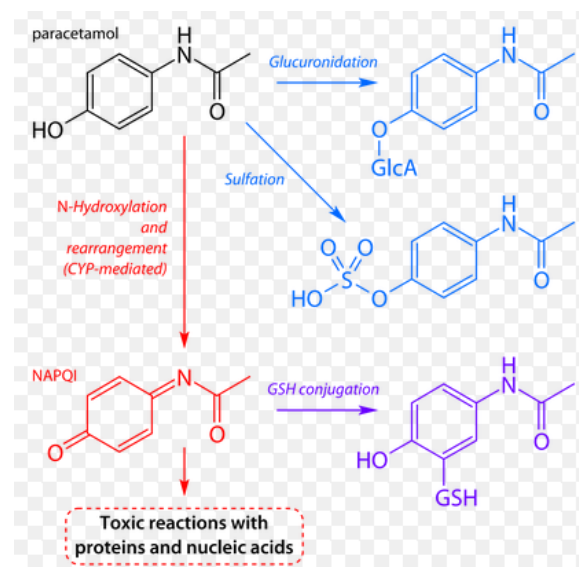


Figura 1. Vías principales de metabolización del paracetamol. Las vías en azul y morado llevan a metabolitos no tóxicos, mientras que la roja conduce al producto tóxico NAPQI

A dosis supratrapéuticas (>4g/día) de paracetamol, la vía de sulfatación se satura, mientras que la glucuronidación y la oxidación aumentan, y una cantidad más pequeña se excreta sin cambios. Después de una dosis altamente tóxica de acetaminofén, la glucuronidación también se satura, y proporciones más altas del fármaco se elimina sin cambios (10%) y se oxidan a NAPQI (> 15%).

El exceso de NAPQI finalmente agota las reservas de GSH y comienza a formar aductos de proteínas mediante la unión a grupos de cisteína en las proteínas celulares. El NAPQI se dirige principalmente a las proteínas mitocondriales y canales iónicos que conducen a la pérdida de producción de energía, desequilibrio de iones y muerte celular. Sin embargo, la N-acetilcisteína es un antídoto eficaz para la sobredosis de paracetamol porque repone tiendas de GSH, neutraliza especies reactivas del oxígeno en las mitocondrias y mejora la sulfatación⁴.

2.2. Sistema de perfusión ex-vivo de placenta humana

El sistema de perfusión ex-vivo de un cotiledón aislado de placenta humana es un modelo experimental utilizado para investigar el paso de sustancias a través de la placenta humana y su metabolismo. Tras el parto se recoge la placenta y se aísla un cotiledón en el laboratorio⁵.

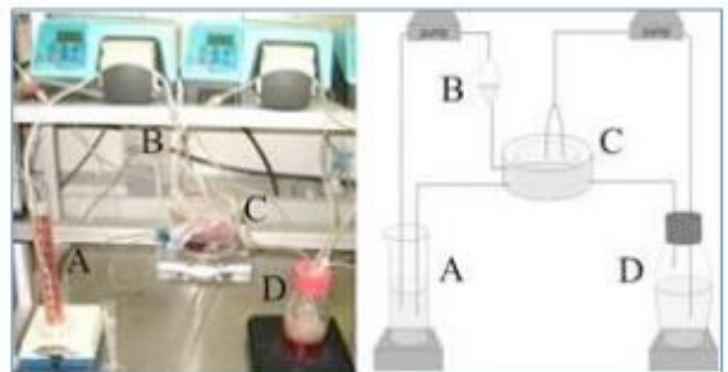


Figura 2. Sistema de perfusión ex-vivo de placenta humana

Las circulaciones fetal y materna se reestablecen por un sistema de bombeo, y así el transporte de las sustancias de ensayo elegidas pueden ser investigadas. El depósito fetal (A) se encuentra en el lado izquierdo y el depósito materno (D) en el derecho, mientras que en la parte superior de cada uno se sitúa un dispositivo de agitación magnética. El tubo del flujo fetal contiene una trampa de burbujas (B), y por encima de él se sitúan dos bombas peristálticas. En el centro del sistema se encuentra la cámara de perfusión (C). Todo el sistema se encuentra en un banco de flujo caliente que lo mantiene a una temperatura de 37°C.

2.3. Antecedentes

Tabla I. Métodos analíticos optimizados por distintos autores que han sido la base del método analítico diseñado por nosotros

Artículo	Metabolitos separados	Muestra	Rangos de concentración	MS-MS: modo de ionización	Columna	Fase móvil	Gradiente y tiempo de separación
Gicquel et al. (2013). ⁶	APAP, APAP-GLU, APAP-SULF	Plasma de rata	0.25-20 mg/L	Positivo y negativo	Fase inversa C18 (3.0 µm, 2.1 x 100 mm)	CH ₂ O ₂ al 1% y MeOH (80:20, v/v)	Elución isocrática. Tiempo: 10'.
Li W et al. (2012). ⁷	APAP, APAP-GLU, APAP-SULF	PCR a partir de sangre humana seca	50,0 a 5000 ng/ml	Negativo	Fase normal T3 (50 x 2,1 mm, 3,0 µm)	A: 10 mM formiato de amonio en agua con 0,01% de hidróxido de amonio B: metanol	0-0.5': 2% B 0.5-2.5': 2 a 30% B 2.5-2.6': 30 a 95% B Mantener B al 95% durante 0,5' y luego bajar B al 2% en el 3,11' seguido por un equilibrio de la columna durante 4,7' usando B al 2%
An et al. (2012). ⁸	APAP, APAP-Cys, APAP-Glc, APAP-Glth, APAP-NAC, APAP-OMe, APAP-Sul	Plasma de rata	- APAP, APAP-Glc y APAP-Sul: 0.1-100 µg/mL - APAP-Glth, APAP-Cys y APAP-NAC: 0.01-2.5 µg/mL - APAP-OMe: 0.01-1 µg/mL	Positivo y negativo	Fase inversa C18 (2.0 x 10 mm, 5 µm)	A: 0.1% ácido fórmico en 95% agua B: 0.1% ácido fórmico en 95% ACN	0-1': 0% B 1-8': 0-80% B 8-9': 80% B 9-9,5': 80-0% B 9,5-16': 0% B
Tan et al. (2012). ⁹	APAP APAP-Glc	Plasma humano y orina	- APAP: 10-3000 ng/mL en plasma - APAP-Glc: 10-15000 ng/mL en plasma	Positivo	Fase inversa C18 (100 mm x 2.1 mm 3.0 µm)	AcN-MeOH-agua con 0.0875% de ácido fórmico (4:4:92 v/v/v)	Elución isocrática Tiempo total: 6,5'
Kusumoto et al. (2013). ¹⁰	APAP APAP-Glc APAP-Glth APAP-Sul	Fase móvil	---	Positivo	Fase inversa C18 (2.1x100 mm, 1.7 µm)	A: 10 mM acetato de amonio B: 100% ACN	0-1': 0% B 1-5': 0-50% B 5-7': 50% B 7,1-10': 50-0% B

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

3. OBJETIVOS

El propósito de este trabajo fue desarrollar y validar un método LC-MS/MS para la detección y cuantificación del paracetamol y sus dos metabolitos principales (4-acetaminofenil- β -D-glucurónido y 4-acetaminofenil sulfato) en perfusiones placentarias.

Para llevar a cabo este proyecto colaboraron dos departamentos, la sección de Ciencias Bioanalíticas, del departamento de Farmacia, y la sección de Salud Ambiental, del departamento de Salud Pública, ambas pertenecientes a la Universidad de Copenhague (Dinamarca).

En el primer departamento se desarrollaron los métodos analíticos para la determinación de las diferentes sustancias, mientras que el segundo fue responsable de llevar a cabo las perfusiones placentarias y de aportar las pre-perfusiones maternas.

Debido a problemas con el comité ético (encargado de aprobar las perfusiones), no pudimos analizar directamente las muestras de perfusión placentaria, por lo que todos los métodos se desarrollaron ex-vivo utilizando pre-perfusiones maternas.

Dado el carácter experimental del proyecto, el tiempo que se ha invertido en llevarlo a cabo y los resultados obtenidos, ha sido utilizado como Trabajo de Fin de Grado bajo la supervisión de la profesora Sofía Ródenas de la Rocha.

4. METODOLOGÍA

4.1. Reactivos utilizados en la fase móvil

El paracetamol y sus metabolitos fueron adquiridos de Aldrich Chemical Company.

El metanol utilizado para LC-MS fue obtenido de ChemSolute (marca de TH.GEYER).

El acetato de amonio procedió de Merck (Milipore).

El agua milli-Q fue preparada en la casa con UV Direct-Q 3 de Molipore.

La fase móvil se preparó según es indicado en la Tabla II.

Tabla II. Composición de la fase móvil

Nombre	Composición
Fase móvil A	10 mM acetato de amonio pH 6,5 (preparado disolviendo 0,77g de acetato de amonio en 1L de MQ) ¹⁴
Fase móvil B	100% MeOH

Preparación de la solución patrón:

50 mg de APAP/APAP-GLU/APAP-SULF fueron añadidos en 50 mL de MeOH para preparar una solución patrón de 1 mg/mL.

La solución patrón de 1 mg/mL fue diluida para obtener una concentración de 100 µg/mL tomando 100 µL de la misma y 900 µL de metanol.

Los patrones se prepararon según se indica en la Tabla III:

Tabla III. Preparación de los patrones utilizados en fase móvil

Concentración	Volumen de solución estándar	Volumen de MeOH
20 µg/mL	200 µL de 100 µg/mL	800 µL
15 µg/mL	150 µL de 100 µg/mL	850 µL
10 µg/mL	100 µL de 100 µg/mL	900 µL
5 µg/mL	50 µL de 100 µg/mL	950 µL
2 µg/mL	100 µL de 20 µg/mL	900 µL
1 µg/mL	100 µL de 10 µg/mL	900 µL
0,5 µg/mL	100 µL de 5 µg/mL	900 µL

4.2. Reactivos utilizados en pre-perfusión materna

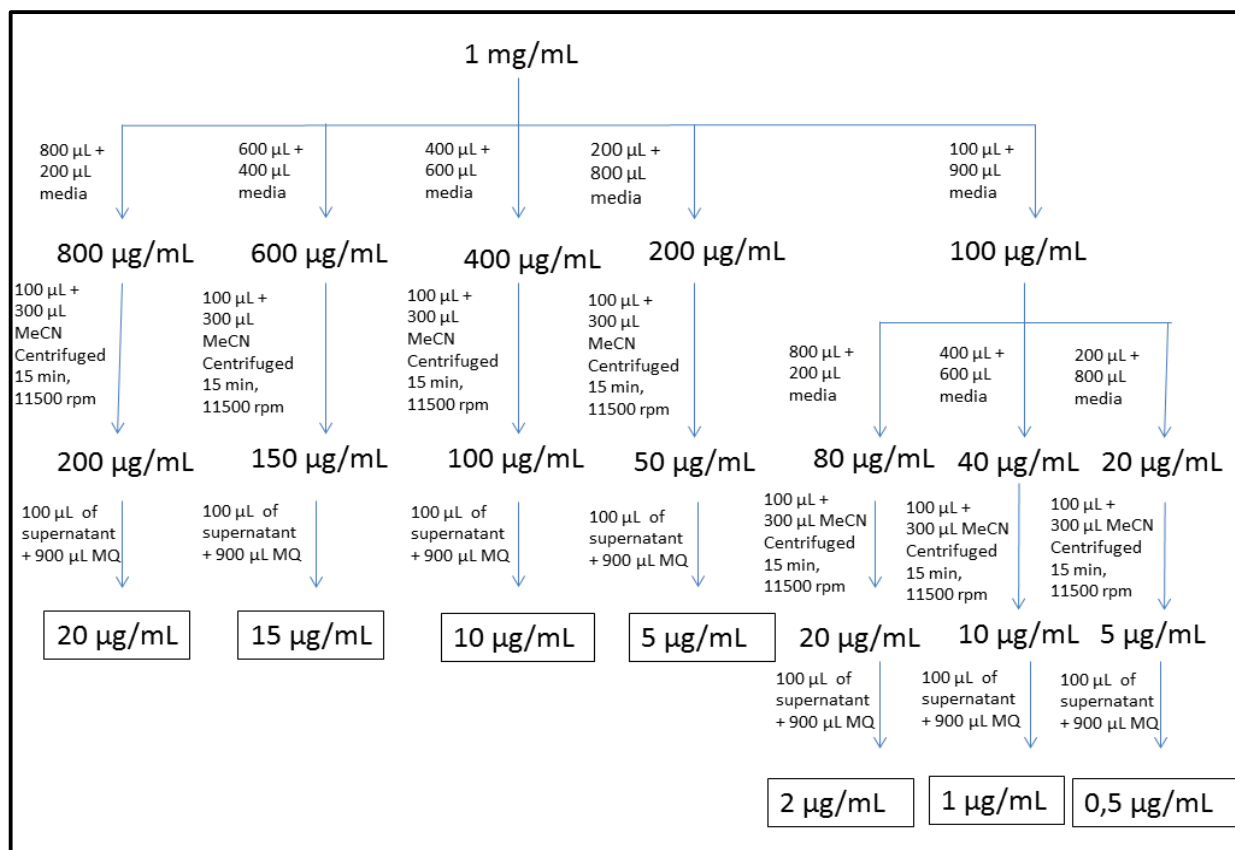
Pre-perfusión materna:

- Cultivo celular (RPMI 1640, Panum Institute, Universidad de Copenhague) suplementado con 1 mL de L-glutamina (200 mM), penicilina y estreptomicina (1%).
- Para ayudar a la disolución de los compuestos lipófilos se añadieron niveles fisiológicos de albúmina de suero humano (HSA) (30 g/L).
- Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 4000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un vial
- El sobrenadante se almacenó a -20°C

30 mg de APAP/APAP-GLU/APAP-SULF fueron añadidos en 30 mL de ACN para preparar una solución patrón de 1 mg/mL

Los patrones se prepararon según es indicado en la Tabla IV:

Tabla IV. Preparación de los patrones en pre-perfusión materna



4.3. Instrumentos

Cromatografía líquida: la separación cromatográfica fue llevada a cabo usando HPLC (Dionex Ultimate 3000) con una columna Kinetex C18 100A (100 mm x 2.1 mm, 2,6 μ m)

Espectrómetro de masas: para la detección se usó un espectrómetro de triple cuadrupolo en modo ionización positivo (TSQ Quantum Access MAX Triple-Stage Quadrupole Mass Spectrometer, Thermo Fisher).

4.4. Método

Las condiciones del método analítico desarrollado se incluyen en las tablas V y VI.

Tabla V. Parámetros del espectrómetro de masas para los distintos compuestos

	PARACETAMOL		APAP-GLU		APAP-SULF	
Velocidad de flujo(μ L/min)	15		20		20	
Concentración (μ g/mL)	1		10		10	
Señal	1,97e7		1,40e6		5,40e6	
Energía de colisión	25		20		20	
Tiempo de análisis	0,5		0,5		0,5	
Pico base (m/z)	152,0		328,13		232,02	
Fragmentos (m/z)	110,0 ; 93,0 ; 65,0		152,67 ; 110,52		152,4 ; 110,76	
	Válvula	Retorno	Válvula	Retorno	Válvula	Retorno
Voltaje de nebulización	5000	4977	5000	4977	5000	4976
Presión de gas de barrido iónico	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2
Presión del gas auxiliar	30	30	25	25	30	30

Tabla VI. Parámetros utilizados durante la fase experimental

GRADIENTE	FLUJO	PRESIÓN	VOLUMEN DE INYECCIÓN
0-1 min: 3-10 % B 1-6 min: 10-60 % B 6-7 min: 60-100 % B 7-9 min: 100 % B 9-9,1 min: 100-3 % B 9,1-12 min: 3 % B	0,3 mL/min	223 bar	5 μ L

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El paracetamol y sus dos metabolitos principales fueron separados mediante una columna Kinetex C18 100A (100 mm x 2.1 mm, 2,6 μm) usando 10 mM acetato de amonio (pH 6,5) y MeOH 100%. Todos los componentes fueron eluidos en menos de 7 minutos usando un gradiente de 12 minutos. La detección se llevó a cabo en modo ESI positivo. Los rangos de concentración para el método fueron establecidos entre 0,5 y 20 $\mu\text{g/mL}$.

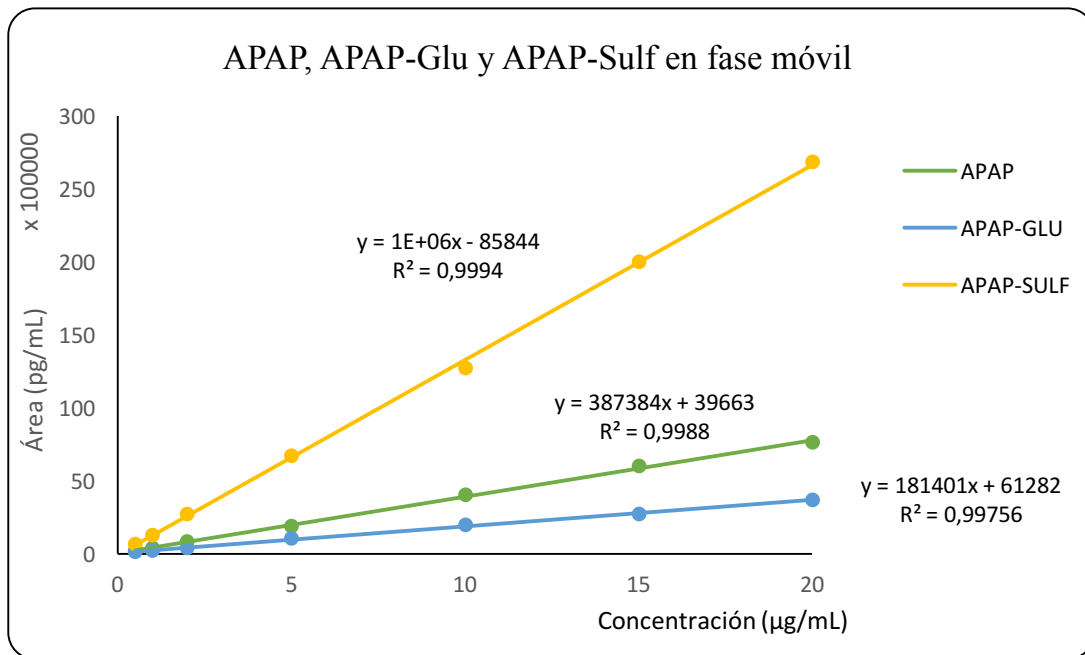
5.1. Linealidad

Se define linealidad como la capacidad del método para establecer una relación directamente proporcional entre la señal instrumental y la concentración real de analito en la muestra¹¹.

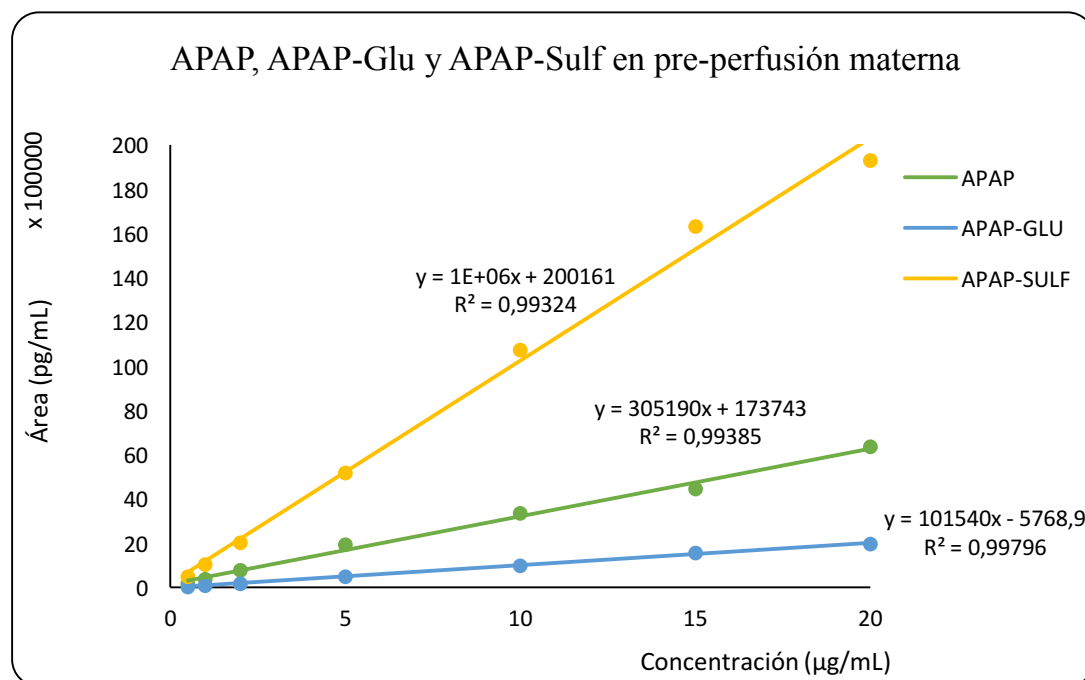
La linealidad se analiza preparando una serie de muestras patrón con diferentes concentraciones conocidas y determinando experimentalmente las concentraciones mediante el método utilizado. A continuación se representan gráficamente los datos obtenidos experimentalmente frente a los valores reales, obteniéndose así una recta con pendiente la unidad y con valor de ordenada en el origen cero. El coeficiente de correlación (r) debe ser la unidad. Generalmente se considera que el método es lineal si $r \geq 0,9900$.

Respecto a los resultados obtenidos, tanto en fase móvil como en preperfusión materna, los resultados se consideran aceptables debido a que el coeficiente de correlación (r) es superior a 0,9900.

En las siguientes gráficas se representan las curvas de calibrado obtenidas tanto en fase móvil como en pre-perfusión materna.



Curva de calibrado I. Paracetamol y metabolitos en fase móvil



Curva de calibrado II. Paracetamol y metabolitos en pre-perfusión materna

5.2. Límites de detección

El límite de detección (LD) se define como la mínima concentración de analito que puede ser detectada en una muestra, aunque no necesariamente cuantificada.

El método utilizado en este estudio para conocer el LD ha consistido en realizar medidas replicadas del blanco de reactivos para después hallar con los datos obtenidos la media aritmética (\bar{X}) y la desviación estándar (S). La siguiente expresión permite el cálculo del límite de detección: $LD = \bar{X}_{\text{blanco}} + 3S_{\text{blanco}}$

Los límites de detección de paracetamol, APAP-GLU y APAP-SULF son los siguientes:

Tabla VII. LD de APAP, APAP-Glu y APAP-Sulf

	FASE MÓVIL (pg/mL)	PRE-PERFUSION MATERNA (pg/mL)
APAP	0,9510	2,1611
APAP-GLU	1,3593	1,2419
APAP-SULF	13,6201	2,2888

5.3. Precisión

La precisión es el grado de concordancia existente entre distintos datos que se han obtenido de una misma forma, es decir, una medida del error aleatorio.

Para la determinación de la precisión se utiliza el coeficiente de variación porcentual (%CV). Así pues, se determina una misma muestra analítica un número de veces, en este caso tres, y con los datos obtenidos se halla la media aritmética (\bar{X}) y la desviación estándar (S).

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Existen dos formas de evaluar la precisión, mediante pruebas intraensayo e interensayo.

Las pruebas intraensayo son aquellas que analizan una misma muestra en un corto periodo de tiempo bajo las mismas condiciones. Así pues, el %CV suele ser inferior que en las pruebas interensayo, ya que en éstas se analiza la misma muestra en distintos periodos de tiempo de forma que las condiciones pueden variar.

De esta manera, el límite máximo de coeficiente de variación porcentual se estableció en un 5% para las muestras en fase móvil en ambos tipos de pruebas mientras que para las pruebas en pre-perfusión materna se consideró un máximo de un 5% para las intraensayo y un 10% en las pruebas interensayo, ya que es más difícil conseguir una alta precisión debido a la variabilidad de la matriz biológica¹².

La precisión (%CV) es aceptable en todas las muestras debido a que cumplen los límites establecidos anteriormente a excepción de la prueba interensayo de APAP-Sulf 5 µg/mL, la cual supera el límite en un 0,51%.

En la tabla VIII se adjuntan los resultados obtenidos.

Tabla VIII. %CV paracetamol, APAP-Glu y APAP-Sulf

Componente	Concentración (µg/mL)	Tipo de muestra	Número de muestras (n=3)	% CV
APAP	0,5	Fase móvil	Intraensayo	1,15
			Interensayo	2,42
		P. materna	Intraensayo	2,81
			Interensayo	7,88
	5	Fase móvil	Intraensayo	0,45
			Interensayo	0,47
		P. materna	Intraensayo	1,47
			Interensayo	2,78
	20	Fase móvil	Intraensayo	0,31
			Interensayo	1,13
		P. materna	Intraensayo	0,48
			Interensayo	2,54
APAP-GLU	0,5	Fase móvil	Intraensayo	3,73
			Interensayo	2,42
		P. materna	Intraensayo	3,95
			Interensayo	5,05
	5	Fase móvil	Intraensayo	1,43
			Interensayo	6,75
		P. materna	Intraensayo	2,55
			Interensayo	9,49
	20	Fase móvil	Intraensayo	1,44
			Interensayo	4,60
		P. materna	Intraensayo	1,23
			Interensayo	5,36
APAP-SULF	0,5	Fase móvil	Intraensayo	1,45
			Interensayo	0,60
		P. materna	Intraensayo	1,96
			Interensayo	3,36

	5	Fase móvil	Intraensayo	1,00
			Interensayo	1,07
		P. materna	Intraensayo	1,92
			Interensayo	10,51
	20	Fase móvil	Intraensayo	2,39
			Interensayo	1,76
		P. materna	Intraensayo	5,62
			Interensayo	0,41

6. CONCLUSIONES

El método de HPLC-MS/MS desarrollado para analizar paracetamol y sus dos metabolitos principales permitió la integración de los tres componentes en un solo método.

La linealidad, la precisión y los límites de detección han sido muy aceptables a todas las concentraciones tanto en la fase móvil como en la pre-perfusión materna.

Hubiera sido muy interesante trabajar con muestras reales de perfusión placentaria con el fin de aplicar el método desarrollado, pero quedará como un proyecto futuro una vez que el comité ético dé su aprobación.

7. BIBLIOGRAFÍA

1 Modick H, Weiss T, Dierkes G, Brüning T, Koch HM. Ubiquitous presence of paracetamol in human urine: sources and implications. *Reproduction*. 2014 Mar 4;147(4):R105-17. doi: 10.1530.

2 Kristin Thielea, Timo Kesslerb, Petra Arcka, Annette Erhardt b, Gisa Tiegsb. Acetaminophen and pregnancy: short- and long-term consequences for mother and child. *Journal of Reproductive Immunology* 97 (2013) 128– 139.

3 Nielsen JK, Modick H, Mørck TA, Jensen JF, Nielsen F, Koch HM, Knudsen LE. N-acetyl-4-aminophenol (paracetamol) in urine samples of 6-11-year-old Danish school children and their mothers. *Int J Hyg Environ Health*. 2015 Jan;218(1):28-33. doi: 10.1016.

4 Mazaleuskaya Liudmila L, Sangkuhl Katrin, Thorn Caroline F, FitzGerald Garret A, Altman Russ B, Klein Teri E. "PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses" *Pharmacogenetics and genomics* (2015).

5 Päivi Myllynen, Line Mathiesen, Marc Weimer, Kirsi Annola, Elina Immonen, Vesa Karttunen, Maria Kummu, Thit Juul Mørck, Jeanette Kolstrup Søgaard Nielsen, Lisbeth Ehlert Knudsen, Kirsi Vähäkangas. Preliminary interlaboratory comparison of the ex vivo dual human placental perfusion system. *Reproductive Toxicology* 30 (2010) 94–102.

6 Gicquel T1, Aubert J, Lepage S, Fromenty B, Morel I. Quantitative analysis of acetaminophen and its primary metabolites in small plasma volumes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2013 Mar;37(2):110-6. doi: 10.1093/jat/bks139. Epub 2013 Jan 12.

7 Li W, Doherty JP, Kulmatycki K, Smith HT, Tse FL. Simultaneous LC-MS/MS quantitation of acetaminophen and its glucuronide and sulfate metabolites in human dried blood spot samples collected by subjects in a pilot clinical study. *Bioanalysis*. 2012 Jun;4(12):1429-43. doi: 10.4155/bio.12.119.

8 An JH, Lee HJ, Jung BH. Quantitative analysis of acetaminophen and its six metabolites in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 2012 Dec;26(12):1596-604. doi: 10.1002/bmc.2737. Epub 2012 Jun 5.

9 Tan QY, Zhu RH, Li HD, Wang F, Yan M, Dai LB. Simultaneous quantitative determination of paracetamol and its glucuronide conjugate in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Apr 15;893-894:162-7. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.02.027. Epub 2012 Feb 23.

10 Kusumoto K, Nagao T, Ogihara T. A new high-throughput analysis for drug metabolism profiling using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Drug Res (Stuttg).* 2013 Apr;63(4):171-6. doi: 10.1055/s-0033-1333782. Epub 2013 Mar 7.

11 Ródenas de la Rocha S, López Ruíz B, Sánchez-Paniagua López M. *Manual de Química Analítica I. Sección Departamental de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.* ISBN: 978-84-694-3950-0.

12 Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* 2007 Jan 17;165(2-3):216-24. Epub 2006 Jun 16.