

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS PARA LA
DETERMINACION SIMULTANEA DE
ANTIMICROBIANOS PROPUESTOS EN EL
TRATAMIENTO DE ACTINOMICETOMA

Por

M. C. NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Biomédica

Año de 2006

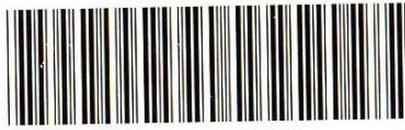
TD

Z6658

FM

2006

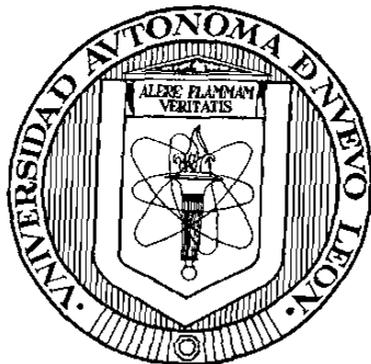
.C376



1020154705

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN
SIMULTÁNEA DE ANTIMICROBIANOS PROPUESTOS EN EL
TRATAMIENTO DE ACTINOMICETOMA**

Por

M.C. NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Química Biomédica**

Agosto del 2006



FONDO
TESIS

TD
Z6658
FM
2006
.C376

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ANTIMICROBIANOS
PROPUESTOS EN EL TRATAMIENTO DE ACTINOMICETOMA**

Presentado por:

M.C. Norma Cecilia Cavazos Rocha

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio Interdisciplinario y de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario, bajo la asesoría de la Dra. María de la Luz Salazar Cavazos y la co-asesoría del Dr. Lucio Vera Cabrera y del Dr. Oliverio Welsh Lozano.

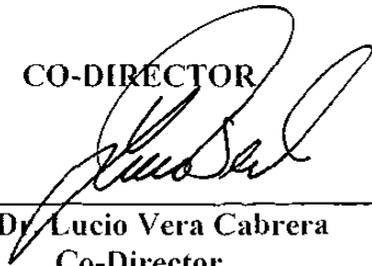
FIRMAS

DIRECTOR



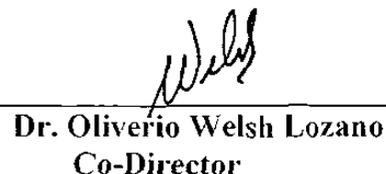
Dra. María de la Luz Salazar Cavazos

CO-DIRECTOR



Dr. Lucio Vera Cabrera
Co-Director

CO-DIRECTOR



Dr. Oliverio Welsh Lozano
Co-Director

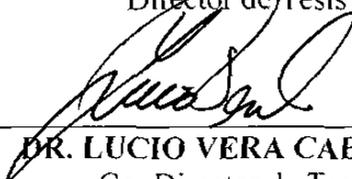
**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ANTIMICROBIANOS
PROPUESTOS EN EL TRATAMIENTO DE ACTINOMICETOMA**

Aprobación de la Tesis:



DRA. MA DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS

Director de Tesis



DR. LUCIO VERA CABRERA

Co- Director de Tesis



DR. OLIVERIO WELSH LOZANO

Co-Director de Tesis



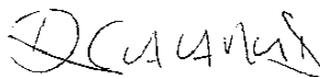
DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

Comisión de Tesis



DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA

Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Subdirector de
Estudios de Posgrado

RESUMEN

M.C. Norma Cecilia Cavazos Rocha

Fecha de graduación: Agosto 2006

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ANTIMICROBIANOS PROPUESTOS EN EL TRATAMIENTO CONTRA ACTINOMICETOMA

Número de páginas: 125

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Química Biomédica

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y Método de Estudio:

El Micetoma es un síndrome anatomoclínico de tipo inflamatorio crónico que afecta piel, tejido celular, a menudo huesos y en ocasiones vísceras. La localización más frecuente es el pie, y se caracteriza por aumento de volumen, deformación del área, y fistulas que drenan un exudado seroso o purulento en el que se encuentra el microorganismo formando "granos". Para el tratamiento del micetoma causado por *Nocardia brasiliensis* (actinomicetoma) se utiliza el esquema trimetoprim-sulfametoxazol, y, para casos severos, se añade la amikacina. Sin embargo, este tratamiento debe administrarse por varios meses y aún años, y en ocasiones no se logra la recuperación del paciente. Además, el tratamiento con amikacina puede presentar efectos secundarios como nefrotoxicidad y ototoxicidad. Por esta razón, es necesario la evaluación de nuevos agentes que permitan una cura más efectiva sin presentar efectos colaterales. Se han evaluado nuevos antimicrobianos, entre ellos linezolid y garenoxacina, los cuales han demostrado una gran actividad contra *Nocardia brasiliensis*. Es necesario contar con métodos analíticos rápidos, sensibles y exactos que permitan la medición de estos agentes en estudios *in vivo* para obtener datos que permitan estudiar la farmacocinética y farmacodinamia de estos nuevos agentes.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar métodos analíticos para determinar en forma simultánea antimicrobianos que han presentado una actividad notable contra esta bacteria. Los antibióticos determinados en este trabajo fueron linezolid, garenoxacina, amoxicilina, y sulfametoxazol- trimetoprim. Se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada con detectores UV de arreglo de diodos y de Fluorescencia. Se desarrollaron las técnicas de extracción de estos antimicrobianos a partir de plasma y tejido de ratón infectado con actinomicetoma, ya que el ratón será utilizado como modelo animal para la evaluación de la efectividad del tratamiento con estos nuevos antimicrobianos aplicados en forma individual o en mezclas. Los métodos desarrollados fueron validados tomando en cuenta los parámetros de validación establecidos por la FDA en el documento Guías de validación para métodos analíticos.

El tratamiento establecido para la extracción de antimicrobianos tanto de plasma como de tejido de ratón fue la precipitación de proteínas. Al trabajar en plasma se obtuvieron recuperaciones desde 71% para la amoxicilina hasta 118% para trimetoprim. La precisión del método fue de un 5.8% hasta 12% para los diferentes antimicrobianos. Los límites de cuantificación establecidos son de 2.4 µg/mL para la amoxicilina y de 0.3 µg/mL para linezolid, garenoxacina, trimetoprim y sulfametoxazol. En tejido de ratón infectado con actinomicetoma se obtuvieron recuperaciones desde 72% para la amoxicilina hasta 122 % para el sulfametoxazol. Los límites de cuantificación establecidos son de 3.75 µg/mL para la amoxicilina y de 0.375 µg/mL para el resto de los antimicrobianos. Las muestras de plasma con antimicrobianos son estables en congelación a -20°C hasta por seis meses.

Conclusiones y Contribuciones

Los métodos desarrollados para la determinación de antimicrobianos en plasma y tejido de ratón son rápidos, sencillos, económicos, sensibles y exactos. Son aplicables para la determinación de estos agentes tanto en plasma como en tejido ya que permiten cuantificar concentraciones iguales o menores a la concentración mínima inhibitoria establecida para *Nocardia barsiliensis*. Los métodos desarrollados permitirán continuar con el estudio de la farmacocinética y farmacodinamia de estos agentes y contribuirán para seleccionar el tratamiento más eficaz y adecuado para esta enfermedad.

FIRMA DEL DIRECTOR

Dra. Ma. De la Luz Salazar Cavazos.

DEDICATORIA

A Héctor, mi esposo,
porque juntos hemos llegado hasta el final de este trabajo

A mi Ceci, Keko y Cynthia Marcela,
con todo mi amor.

A mis padres, Norma y Francisco (†)
porque siempre están ahí, donde yo estoy.
Gracias a ellos soy lo que soy.

A mis hermanos, Connie, Isaac y Paco.

A los papás de Héctor, también mis papás,
Lilia y Ezequiel,
por su gran apoyo, paciencia y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque gracias a Él todo es posible.

A mi esposo Héctor y mis hijos Cecy, Héctor y Marce, por aguantar, comprender y apoyarme.

A mis hermanos Conny, Isaac y Paco, y la familia de cada uno de ellos, por su apoyo, por todo lo que hemos vivido, y que nos impulsa a continuar siempre juntos.

A mi cuñada Lety, por su gran apoyo, ayuda y comprensión.

A la Dra. María de la Luz Salazar, gracias por su amistad, por compartir sus conocimientos, por su tiempo, su esfuerzo, su apoyo y sus consejos.

A la Dra. Noemí Waksman, por su tiempo dedicado a este trabajo y por sus consejos.

Al los miembros de mi comisión, Dr. Lucio Vera, Dr. Oliverio Welsh y Dr. Mario César Salinas, por su tiempo y sus conocimientos compartidos.

A Lidia, gracias por tu apoyo en todo momento y tus consejos que siempre me ayudaron a seguir adelante

A Idalia, gracias por compartir conmigo las etapas de este trabajo, (y con los ratoncitos también). Gracias a ti y a tu familia.

A mis amigos y compañeros de posgrado, en especial a Aurora, a la maestra Nora y a Anabel, por el tiempo que pasamos juntas en el laboratorio, por escucharme, por sus consejos, apoyo y por su tiempo. Por darme cuenta que gracias a esta amistad, vale la pena continuar.

A Maribel, por su gran apoyo, siempre cuidando el buen funcionamiento del cromatógrafo, y por su amistad.

A Marta y a Gloria, por aguantarme y ayudarme siempre que se los solicitaba

A Agustín, por su buena disposición y su apoyo.

A Ivonne, Lucy, Ricardo, a todos mis compañeros de trabajo, y a todas aquellas personas que no mencioné, pero que contribuyeron a la terminación de esta tesis.
GRACIAS!!!

A CONACYT por el apoyo económico personal durante este trabajo

A SEP-PROMEP/103.5/022346 y PAICYT CA855-04 por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α	Factor de selectividad
ACN	Acetonitrilo
AMX	Amoxicilina
ANOVA	Análisis de varianza
β	Beta
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
C ₈	Columna cromatográfica de fase inversa de octasilano
C ₁₈	Columna cromatográfica de fase inversa de octadecilsilano
CV	Coefficiente de variación
°	Grado
DAD	Detector de arreglo de diodos
DDS	4,4 diamino dimetil sulfona
DNBC	Dinitrobencilcloruro
ds	Desviación estándar
FDNB	Fluoro 2,4 dinitrobenceno
FR	Factor de respuesta
g	Gramos
GR	Garenoxacina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
kg	Kilogramo
λ	Longitud de onda
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
L	Litro
LZ	Linezolid
m	Pendiente de la curva de calibración
mg	Miligramo
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MIC ₅₀	Concentración mínima inhibitoria del 50% del crecimiento bacteriano

MIC ₉₀	Concentración mínima inhibitoria del 90% del crecimiento bacteriano
μg	Microgramo
μL	Microlitro
M	Molar
mL	Mililitro
μm	Micrómetro
min	Minuto
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
N	Número de platos teóricos
NaOH	Hidróxido de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de sodio ₄
k'	Factor de capacidad
K ₂ HPO ₄	Fosfato monoácido de potasio
OPA/2 ME	Ortoftaldehído/ 2 mercaptoetanol
PABA	Ácido p-aminobenzoico
pKa	Logaritmo inverso de la constante de acidez
pH	Potencial hidrógeno
%	Por ciento
R	Resolución
RSD	Desviación estándar relativa
S ²	Varianza
SMX	Sulfametoxazol
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
t ₀	Tiempo muerto
tp	Tamaño de partícula
TBA	Fosfato de tetrabutilamonio
tR	Tiempo de retención
TMP	Trimetoprim
t ₀	Tiempo muerto
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético

TNBS	2,4,6 trinitrobencensulfónico
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible
v	Volumen
W	Ancho del pico en su base
\bar{X}	Media o promedio

INDICE

CAPÍTULO

Página

1	INTRODUCCIÓN	
1.1	Micetoma	1
1.1.1	Definición	1
1.1.2	Distribución mundial	1
1.1.3	Etiopatogenia	2
1.1.4	Cuadro clínico	4
1.1.5	Micetoma en México	4
1.1.6	Terapia	6
1.2	Actinomicetoma	7
1.2.1	Tratamiento de actinomicetoma causado por <i>Nocardia brasiliensis</i> .	7
1.3	Características de los antimicrobianos propuestos en el tratamiento de actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i> .	13
1.4	Antecedentes	28
1.4.1	Métodos analíticos para la determinación de antimicrobianos	28
1.4.1.1	Amikacina	29
1.4.1.2	Amoxicilina-Ácido clavulánico	30
1.4.1.3	Linezolid	32
1.4.1.4	Garenoxacina	32
1.4.1.5	Sulfametoxazol-Trimetoprim	33
1.4.2	Tratamiento de la muestra	34
1.4.2.1	Desproteínización	34
1.4.2.2	Extracción en fase sólida	35
1.4.2.3	Análisis de antimicrobianos en fluidos biológicos	35
1.4.2.4	Análisis de antimicrobianos en tejido	36
1.4	Justificación	37
1.5	Objetivo general	38
1.6	Objetivos específicos	38
2	MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1	Equipos	39
2.1	Materiales	40
2.3	Reactivos	41

2.4 Métodos	
2.4.1 Preparación de soluciones	
2.4.1.1 Reactivos	42
2.4.1.2 Estándares	43
2.4.2 Condiciones cromatográficas	44
2.4.3 Optimización del sistema cromatográfico	45
2.4.4 Validación del sistema cromatográfico	
2.4.4.1 Linealidad	48
2.4.4.2 Límite de detección	49
2.4.4.3 Límite de cuantificación	49
2.4.4.4 Precisión	50
2.4.4.5 Robustez	50
2.4.4.6 Estabilidad	52
2.4.5 Métodos de tratamiento de muestra	
2.4.5.1 Elección del solvente de desproteinización	52
2.4.5.2 Elección del volumen de plasma	53
2.4.6 Desarrollo de métodos	
2.4.6.1 Plasma	54
2.4.6.2 Tejido de ratón infectado con actinomicetoma	54
2.4.7 Validación de métodos	
2.4.7.1 Linealidad	55
2.4.7.2 Límite de detección	56
2.4.7.3 Límite de cuantificación	57
2.4.7.4 Precisión	57
2.4.7.5 Exactitud	57
2.4.7.6 Selectividad	58
2.4.7.7 Estabilidad	59
2.4.8 Análisis de Amikacina por CLAR-Fluorescencia con OPA/2ME	59
2.4.9 Aplicabilidad	
2.4.9.1 Determinación en plasma	60
2.4.9.2 Tejido de ratón infectado con actinomicetoma	60

3 RESULTADOS

3.1 Sistema cromatográfico	
3.1.1 Optimización del sistema	62
3.1.2 Validación del sistema: CLAR con detección UV	65
3.1.2.1 Intervalo lineal	65

3.1.2.2 Límites de detección y cuantificación	66
3.1.2.3 Precisión intradía e interdía	68
3.1.2.4 Robustez	69
3.1.2.5 Estabilidad	70
3.1.3 Validación del sistema CLAR con detección por Fluorescencia	71
3.1.3.1 Intervalo lineal	71
3.1.3.2 Límites de detección y cuantificación	73
3.1.3.3 Precisión intradía e interdía	73
3.1.3.4 Robustez	74
3.1.4 Análisis d Amikacina por CLAR-Fluorescencia OPA/2ME	75
3.2 Métodos analíticos desarrollados en plasma y tejido	77
3.2.1 Tratamiento de la muestra	
3.2.1.1 Elección del solvente	77
3.2.1.2 Volumen de la muestra	78
3.2.2 Validación del método cromatográfico para la determinación de antimicrobianos en plasma: CLAR-UV 254 nm	79
3.2.2.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación	80
3.2.2.2 Precisión	82
3.2.2.3 Exactitud	84
3.2.2.4 Selectividad	84
3.2.2.5 Estabilidad	85
3.2.3 Validación del método cromatográfico para la determinación de antimicrobianos en plasma: CLAR -Fluorescencia	
3.2.3.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación	87
3.2.3.2 Precisión	87
3.2.3.3 Exactitud	88
3.2.4 Validación del método cromatográfico para la determinación de antimicrobianos en tejido de ratón infectado con actinomicetoma: CLAR-UV 254 nm	
3.2.4.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación	89
3.2.4.2 Precisión	91
3.2.4.3 Exactitud	92
3.2.4.4 Selectividad	92

3.2.5 Aplicaciones	
3.2.5.1 Determinaciones en plasma	93
3.2.5.2 Determinaciones en tejido de ratón infectado con actinomicetoma	94
4 DISCUSIÓN	
4.1 Desarrollo del método	97
4.1.1 Separación cromatográfica	97
4.1.2 Análisis de Ácido clavulánico	105
4.1.3 Análisis de Amikacina	105
4.1.4 Métodos de detección	106
4.2 Tratamiento de muestras	107
4.3 Validación de los métodos desarrollados	
4.3.1 Intervalo lineal, límites de detección y de cuantificación	109
4.3.2 Precisión	110
4.3.3 Exactitud	111
4.3.4 Robustez	112
4.3.4 Estabilidad	112
4.4 Aplicabilidad	
4.4.1 Determinaciones en plasma	113
4.4.2 Determinaciones en tejido de ratón infectado con actinomicetoma	114
5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	
5.1 Conclusiones	116
5.2 Perspectivas	117
BIBLIOGRAFIA	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Agentes causales de Micetoma.	6
II.	Efecto de la combinación de antimicrobianos en la MIC para aislamientos clínicos de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	10
III.	Efecto de los antimicrobianos en el curso natural de la infección con <i>N. brasiliensis</i> en ratones BALB/c.	11
IV.	Actividad de DA-7867 y otros antimicrobianos contra aislados en <i>Nocardia brasilienses</i> .	11
V.	Condiciones cromatográficas probadas durante el desarrollo del método.	45
VI.	Programas de gradiente de elución utilizados para la optimización del sistema cromatográfico.	46
VII.	Diseño experimental para evaluar robustez.	51
VIII.	Parámetros de eficiencia obtenidos durante la optimización del sistema cromatográfico.	63
IX.	Programa de elución para la separación de los antimicrobianos.	64
X.	Rango lineal y ecuaciones de regresión obtenidos para antimicrobianos. Detección UV.	66
XI.	Límites de detección y cuantificación de antimicrobianos. Detección UV.	68
XII.	Precisión intradía del sistema cromatográfico.	69
XIII.	Precisión interdía del sistema cromatográfico.	70
XIV.	Resultados del ensayo de robustez.	72
XV.	Rango lineal y ecuaciones de regresión obtenidos para antimicrobianos. Detección por Fluorescencia.	72
XVI.	Límites de detección y cuantificación de antimicrobianos. Detección por Fluorescencia.	74

XVII.	Precisión intradía e interdía del sistema cromatográfico.	74
XVIII.	Recuperaciones obtenidas con diferentes agentes precipitantes.	77
XIX.	Análisis de varianza.	78
XX.	Prueba F.	79
XXI.	Rango lineal y ecuaciones de regresión obtenidos para antimicrobianos. en plasma de ratón. Detección por UV.	81
XXII.	Límites de detección y cuantificación de antimicrobianos. Detección UV.	81
XXIII.	Precisión intradía..	83
XXIV.	Precisión interdía.	84
XXV.	Determinación de antimicrobianos en plasma. Recuperaciones obtenidas a tres niveles de concentración.	84
XXVI.	Rango lineal y ecuaciones de regresión obtenidos para garenoxacina en plasma de ratón. Detección por Fluorescencia.	87
XXVII.	Límites de detección y cuantificación para garenoxacina. Detección por Fluorescencia.	88
XXVIII.	Rango lineal y ecuaciones de regresión obtenidos para antimicrobianos en tejido de ratón infectado con actinomicetoma. Detección por UV.	90
XXIX.	Límites de detección y cuantificación para antimicrobianos en tejido de ratón infectado con actinomicetoma. Detección por UV.	92
XXX.	Precisión intradía e interdía.	90
XXXI.	Determinación de antimicrobianos en tejido de ratón infectado con actinomicetoma. Recuperaciones obtenidas a tres niveles de concentración.	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Distribución mundial del micetoma	2
2.	Micetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>	5
3.	Estructura química del sulfato de amikacina	14
4.	Estructura química de la amoxicilina	16
5.	Estructura química del clavulanato de potasio	17
6.	Estructura química de la garenoxacina	19
7.	Estructura química del linezolid	21
8.	Principales metabolitos del linezolid	23
9.	Estructura química del sulfametoxazol	24
10.	Estructura química del trimetoprim	25
11.	Etapas en el metabolismo de folato bloqueado por sulfonamidas y trimetoprim	26
12.	Metabolitos del Sulfametoxazol	28
13.	Reacción del OPA/ 2ME con grupo amino	60
14.	Cromatograma de la mezcla estándar de antimicrobianos a 5 µg/mL por UV	64
15.	Cromatograma de la mezcla estándar de antimicrobianos a 5 µg/mL por Fluorescencia	65
16.	Espectros de absorción de los antimicrobianos	65
17.	Curvas de calibración para cada uno de los antimicrobianos	67
18.	Gráficas control de estabilidad de los antimicrobianos en la mezcla estándar	71
19.	Curvas de calibración de Garenoxacina, Linezolid y Sulfametoxazol por fluorescencia	73
20.	Cromatogramas del análisis de Amikacina con OPA/2ME en estándar y en plasma	76

21.	Cromatograma de la mezcla de estándares a 5 µg/mL en plasma de ratón	79
22.	Curvas de calibración de antimicrobianos en plasma de ratón	82
23.	a) Gráficas control para establecer estabilidad de antimicrobianos en plasma congelado a -20 °C	85
	b) Gráficas control para establecer estabilidad de antimicrobianos en muestras de plasma	86
24.	Cromatograma de la mezcla de estándares en tejido de ratón infectado con actinomicetoma	89
25.	Curvas de calibración de antimicrobianos en tejido	91
26.	Cromatograma del linezolid en plasma de ratón	93
27.	Cromatograma de análisis de garenoxacina por UV y Fluorescencia	94
28.	Análisis de linezolid y garenoxacina en tejido de ratón	95
29.	Análisis de la mezcla sulfametoxazol-trimetoprim-linezolid en tejido de ratón	96

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Micetoma

1.1.1 Definición

El Micetoma es un síndrome anatomoclínico de tipo inflamatorio crónico que afecta piel, tejido celular, a menudo huesos y en ocasiones vísceras. La localización más frecuente es el pie, y se caracteriza por aumento de volumen, deformación del área, y fístulas que drenan un exudado seroso o purulento en el que se encuentra el microorganismo formando “granos”.

1.1.2 Distribución mundial

Esta enfermedad existe en todo el mundo y su distribución depende de condiciones geográficas y ecológicas. Se encuentra sobre todo en una banda transversal que sigue el Trópico de Cáncer, entre los 14 y 33° de latitud norte, principalmente en Asia y África (Figura 1).

En Asia y África predomina en regiones intertropicales con clima subtropical de altura o tropical senegalés, con precipitación pluvial de 150 a 1000 mm. El lugar

de mayor prevalencia en el mundo es Sudán. También es altamente endémico en India, México, Centroamérica y Sudamérica, así como la región del Mediterráneo. En América se ha estudiado más en Brasil, Venezuela y México (Arenas 1993).

Esta enfermedad predomina en el sexo masculino en una proporción de 4 a 1. Se ha observado frecuentemente en campesinos que andan descalzos o usan huaraches, ya que están más expuestos a los traumatismos; también se ha encontrado en individuos con diferentes ocupaciones como estudiantes, profesionistas, obreros, amas de casa, entre otras; generalmente se presenta en una edad entre los 16 y 45 años, aunque se ha reportado en niños desde 3 años hasta adultos de 70 años. Su tiempo de evolución fluctúa entre los 2 y 3 años (Arenas 1993).

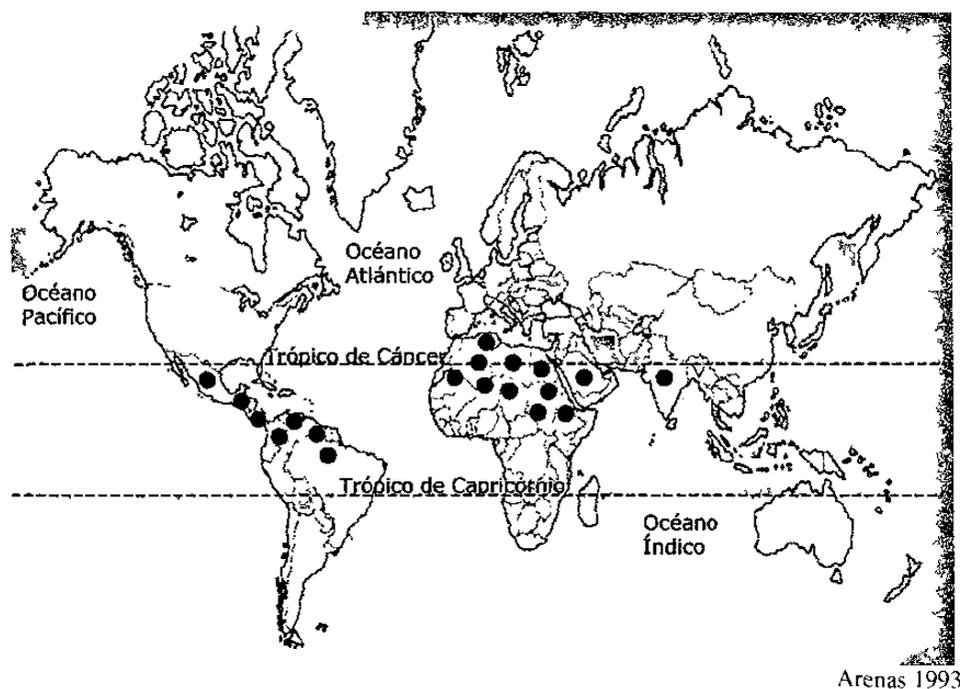


Figura 1. Distribución mundial del micetoma.
El color rojo indica los lugares de mayor frecuencia

1.1.3 Etiopatogenia

El micetoma pueden ser causado por dos grupos de agentes: los eumicetos u hongos verdaderos, y los actinomicetos. En 1963 se obtuvieron datos de la distribución geográfica mundial de 854 casos: 60% fueron actinomicetomas y 40% eumicetomas. La distribución de las especies causales varía con el clima, el relieve del suelo, la precipitación pluvial y otros factores ecológicos. Se encontró la siguiente frecuencia de agentes causales: *Nocardia brasiliensis* 32%, *Madurella mycetomatis* 19%, *Actinomadura pelletieri* 9%, *Actinomadura madurae* 8%, *Streptomyces somaliensis* 7%, *Leptosphaeris senegaliensis* 5% y *Monosporium apiospermum* 3% (Arenas 1993, López Martínez 1992).

Los agentes causales viven como saprófitos en la naturaleza, en el suelo o en los vegetales; se introducen a la piel del ser humano a través de un traumatismo, habitualmente una espina vegetal, pero pueden hacerlo mediante una astilla de madera, piedras, instrumentos metálicos o picaduras de animales contaminados por tierra. Después de la penetración, hay crecimiento lento del microorganismo, con respuesta inmunitaria ineficaz y acumulación de neutrófilos.

En general existe una alta resistencia a la infección. Después de días o meses de incubación, los microorganismos emiten filamentos en los tejidos y se agrupan en colonias más o menos compactas llamadas “granos”, que son eliminados en un exudado mucoide o purulento a través de fistulas. Alrededor del grano hay reacción hística formada principalmente por polimorfonucleares, fibrosis y neoformación vascular. La lesión se extiende por contigüidad; puede haber alteraciones óseas. En la última fase de invasión es posible que afecte tendones, nervios, así como vasos sanguíneos y linfáticos (Arenas 1993).

La evolución es lenta pero progresiva, sin regresión espontánea. Se extiende tanto en la superficie como en planos profundos, tejido subcutáneo, músculos y huesos, los cuales quedan afectados según el microorganismo causal. Invade, e incluso puede destruir, huesos pequeños como los del pie y las vértebras (Arenas 1993).

1.1.4 Cuadro clínico

Suele afectar una región, y el sitio donde con mayor frecuencia se localiza es en las extremidades inferiores; predomina en el pie, aunque puede observarse en cualquier otra localización, como pierna, rodilla, muslo, mano, antebrazo, brazo, hombro, pared abdominal, región preesternal, dorso, y rara vez la cara o la cabeza. El sitio de la lesión tiene relación directa con el punto de inoculación.

El síndrome se caracteriza por aumento de volumen, deformación de la región y numerosos orificios fistulosos, sitios de salida de un exudado seropurulento donde se encuentran los “granos” (Figura 2).

La importancia médica del micetoma radica en su notoria cronicidad, dada en parte por el retardo en el diagnóstico etiológico, por la invasión destructiva de todos los tejidos de la región afectada y por no contar con medicamentos totalmente eficaces para el tratamiento, lo cual conduce a las subsecuentes complicaciones (Arenas 1993).

1.1.5 Micetoma en México.

En México alrededor de 98% de los micetomas son actinomicetomas y el 2% restante son de origen micótico (López Martínez 1992). El 86% de los actinomicetomas son causados por *N. brasiliensis*, el resto se distribuye entre *A. madurae*, *S. somaliensis*, *N. asteroides* y *A. pelletieri* (Tabla I).

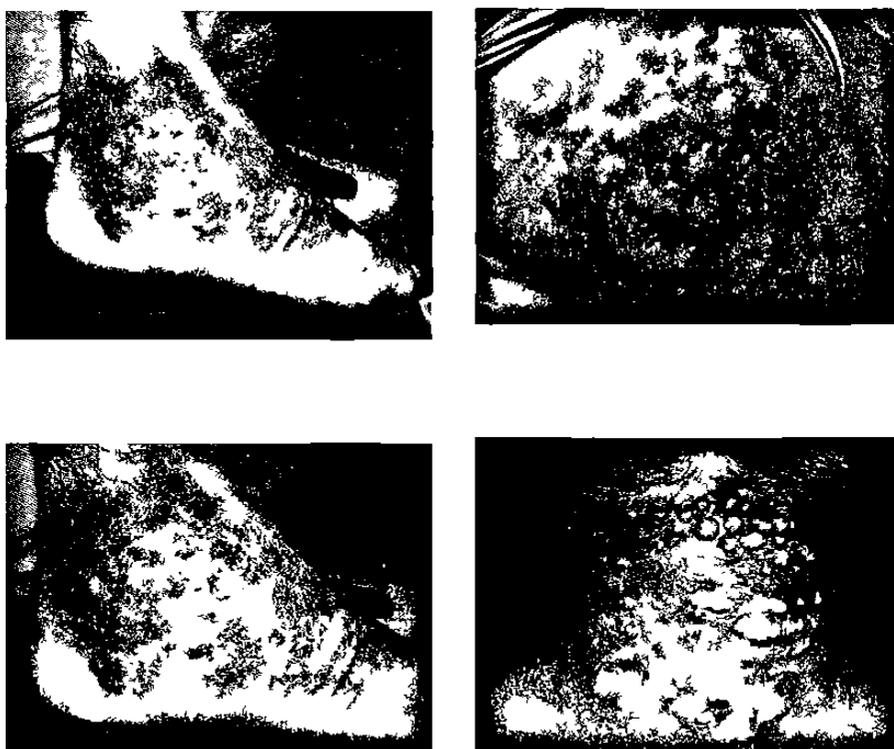


Figura 2. Micetoma en pie por *Nocardia brasiliensis*

TABLA I
AGENTES CAUSALES DE MICETOMA

Eumicetoma	Actinomicetoma
<i>Madurella mycetomatis</i> *	<i>Nocardia brasiliensis</i> *
<i>Monosporium apioespermum</i>	<i>Actinomadura madurae</i>
<i>Madurella grisea</i>	<i>Streptomyces somaliensis</i>
<i>Leptosphaeria senegaliensis</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
	<i>Actinomadura pelletieri</i>
	<i>Nocardia transvalensis</i>
	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>
* Agente causal mas frecuentemente aislado	Welsh 1992

La enfermedad ha sido reportada en numerosos estados, pero la mayor parte de los casos provienen de Morelos, Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Veracruz, Guerrero, Michoacán, Querétaro, Puebla y Oaxaca (Lavalle 1966, López 1992).

En Nuevo León, en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario, se estudiaron 101 casos de micetoma en el período de 1990 al 2003. El 84% de ellos fueron causados por actinomicetomas y de éstos, el 73% fue causado por *Nocardia brasiliensis* (Cantú Garza 2004).

1.1.6 Terapia

Eumicetomas

Se han reportado tratamientos eficaces de eumicetoma utilizando ketoconazol en dosis de 400 mg/día, itraconazol de 300 o 400 mg/día y anfotericina B de 0.5 a 12.5 mg/kg/día. Cuando la lesión no responde a la terapia médica, se requiere el tratamiento quirúrgico. Después de la cirugía, se debe continuar la terapia con

antimicóticos al menos durante 1 ó 2 años para evitar recurrencias de la enfermedad (Welsh, 1994).

Actinomicetomas

El tratamiento de actinomicetomas es con antimicrobianos, principalmente con sulfametoxazol-trimetoprim.

1.2 Actinomicetoma

1.2.1 Tratamiento de actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis*.

En el tratamiento de los actinomicetomas por *Nocardia brasiliensis* se han empleado principalmente las sulfonamidas (DDS), sulfanilamidas, griseofulvina, y, con menor frecuencia, se ha empleado también rifampicina, tetraciclinas, isoniacida, clofazimina y estreptomina (Lavalle 1992, Arenas 1993). En todos los casos los resultados han sido variables, pero el esquema que ha resultado con mayor eficacia de tratamiento ha sido la combinación sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) en dosis de 400 y 80 mg/kg/día respectivamente, administrado durante varios meses o hasta por uno o dos años. Durante los últimos 20 años, éste ha sido considerado el tratamiento de elección; sin embargo, este tratamiento puede causar irritaciones en la piel, problemas gastrointestinales y anemia. A pesar de que esta combinación es dada hasta por dos años, la tasa de curación es del 70% (Welsh, 1994).

Daldovisio en 1978 y Gombert en 1982, reportaron un efecto inhibitorio *in vitro* de amikacina sobre *N. asteroides* (Daldovisio 1978, Gombert 1982). También se reportó que ratones infectados con *Nocardia* habían respondido bien al tratamiento

con este aminoglicósido (Wallace 1979). Con estos antecedentes, Welsh decidió administrar el tratamiento amikacina en combinación con sulfametoxazol-trimetoprim a un paciente con actinomicetoma que presentaba diseminación pulmonar, y en donde se consideró que era requerida una acción terapéutica más rápida y efectiva en un corto plazo. Los resultados clínicos reportados fueron una mejoría notable y una recuperación casi completa del paciente (Welsh, 1985). Posteriormente, en 1987, Welsh y colaboradores reportan una respuesta terapéutica excelente obtenida con amikacina sola y en combinación con sulfametoxazol-trimetoprim, en el tratamiento de 15 pacientes con micetoma actinomicótico que habían presentado previamente una pobre respuesta a los agentes terapéuticos tradicionales y/o cuyos órganos importantes como pulmón, hueso y columna vertebral, estaban comprometidos. En el mismo trabajo se reporta que la combinación amikacina-sulfametoxazol-trimetoprim es bastante superior a otros esquemas de tratamiento y aún al tratamiento con amikacina sola (Welsh 1987).

Por lo anterior, en los últimos 15 años, en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario se ha aplicado como tratamiento para actinomicetoma el esquema de sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) en dosis de 400 y 80 mg/kg/día respectivamente, y, para casos severos está indicada la combinación SXT, en la misma dosis, con amikacina. Esta última se administra en una dosis de 15 mg/kg/día. Este tratamiento se indica por un período de cinco semanas, durante las cuales la amikacina se administra, junto con SXT, durante las primeras tres semanas, y el SXT solo durante las siguientes dos semanas, y así completar un ciclo de tratamiento. Los ciclos de terapéutica pueden variar de entre uno a cuatro (Welsh 1994).

Como se mencionó anteriormente, el uso de la combinación SXT presenta una tasa de curación del 70%, y al combinar SXT con amikacina la tasa de curación aumenta al 95% (Welsh 1987). Sin embargo, en algunos casos, aún con el uso de amikacina, los pacientes no presentan mejoría. Por otra parte, la amikacina, como los otros aminoglicósidos, puede producir efectos secundarios tales como ototoxicidad y nefrotoxicidad. Por estas razones ha sido necesaria la evaluación de la actividad *in vitro* de otros agentes antimicrobianos en contra de *N. brasiliensis*, en busca de obtener mejores alternativas terapéuticas más potentes y menos tóxicas para el tratamiento contra actinomicetoma (Vera-Cabrera 2001, Gómez-Flores 2004).

Gómez Flores y colaboradores evaluaron la actividad *in vivo* e *in vitro* contra *Nocardia brasiliensis* de diversos grupos de antimicrobianos. Se realizó un primer rastreo de actividad con 44 antimicrobianos incluyendo aminoglicósidos, cefalosporinas, penicilinas, quinolonas, macrólidos y algunos otros. Los antimicrobianos que presentaron actividad fueron linezolid, amikacina, gentamicina, isepamicina, netilmicina, tobramicina, minociclina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, nitroxolina y espiramicina. La actividad fue confirmada cuantitativamente con un ensayo utilizando el método de microdilución en placa.

Dado que el esquema de combinación de antimicrobianos parece ser mejor en el tratamiento para actinomicetoma (Gómez-Flores 2004), las combinaciones de amoxicilina-ácido clavulánico, el linezolid y la amikacina fueron probados. En todos los casos se observó un efecto sinergista, particularmente amoxicilina-ácido clavulánico en combinación con linezolid (Tabla II).

TABLA II
EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS
EN LA MIC PARA AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *N. brasiliensis*

Combinación	Efecto		
	Sinergista	Aditivo	Antagonista
Amikacina-SXT	4	7	0
Amoxicilina-Ácido clavulánico-SXT	7	4	0
Linezolid-SXT	7	4	0
Linezolid-Amoxicilina-Ácido clavulánico	9	2	0

(Gómez-Flores 2004)

Para probar el efecto de los antimicrobianos en el curso de la infección con *N. brasiliensis*, los antimicrobianos linezolid, amikacina y amoxicilina-ácido clavulánico fueron probados *in vivo* en un modelo experimental en ratones BALB/c. De los antimicrobianos utilizados, los mejores resultados se obtuvieron con linezolid (Tabla III).

Por todo lo anterior, se sugiere que otros antimicrobianos pueden ser utilizados en el tratamiento de actinomicetoma por *N. brasiliensis* (Gómez-Flores 2004).

Por otra parte, Vera Cabrera y colaboradores reportaron, en el 2004, la actividad *in vitro* de otros antimicrobianos contra aislados de *N. brasiliensis*. Estos antimicrobianos incluían la gatifloxacina, moxifloxacina, garenoxacina (clasificadas como quinolonas) y una nueva oxazolidinona denominada DA-7867. Los resultados obtenidos mostraron una actividad de las tres quinolonas similar a la de amikacina. La quinolona más activa fue la garenoxacina. Los aislados de *N. brasiliensis* mostraron una gran sensibilidad a DA 7867 en comparación con la sensibilidad

mostrada hacia linezolid y amikacina. Estos datos se muestran en la tabla IV (Vera-Cabrera 2004).

TABLA III
EFFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS EN EL CURSO NATURAL
DE LA INFECCIÓN CON *N. brasiliensis* EN RATONES BALB/c*

Grado de infección	No de animales*			
	Solución salina	Linezolid (25 mg/kg)	Amoxicilina-Ácido Clavulánico (25 mg/kg)	Amikacina (25 mg/kg)
4+	9	2	3	5
3+	1	0	0	3
2+	0	0	2	1
1+	2	2	2	1
+/-	0	4	3	0
Negativo	3	7	5	5

* El número indica los animales con el grado de infección.

(Gómez-Flores 2004)

TABLA IV
ACTIVIDAD DE DA-7867 Y OTROS ANTIMICROBIANOS
CONTRA AISLADOS DE *N. brasiliensis*

Antimicrobiano	MIC µg/mL		
	Intervalo (µg/mL)	50%	90%
Amikacina	0.125-4	1	4
SXT	2.3/0.12-19/1	4.75/0.25	9.5/0.5
Linezolid	0.12-2	0.5	1
DA-7867	0.015-0.12	0.03	0.06
Gatifloxacina	0.25-2	0.5	2
Moxifloxacina	0.25-2	0.5	2
Garenoxacina	0.12-1	0.5	0.5

(Vera-Cabrera 2004)

Aunque una actividad *in vitro* de un antimicrobiano es fuertemente presuntiva de su actividad *in vivo*, es necesario confirmar la utilidad clínica de cualquiera de estos antimicrobianos en estudios con animales de laboratorio (Vera-Cabrera 2004). Para estudiar la efectividad del tratamiento de actinomicetoma con estos medicamentos y/o las combinaciones entre ellos, es necesario contar con métodos analíticos que permitan la determinación y cuantificación de estos agentes en tejidos y fluidos biológicos. Esto permitiría correlacionar datos de mediciones de niveles de estos antimicrobianos con datos clínicos y de esta manera seleccionar el esquema de tratamiento más adecuado.

Este trabajo de tesis surge en respuesta a la necesidad del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de evaluar nuevos antimicrobianos que puedan ser utilizados, solos o en sus combinaciones, en el tratamiento de actinomicetoma. La determinación de las concentraciones de estos antimicrobianos tanto en plasma como en tejido contribuirá al estudio de su farmacocinética y la selección del o los agentes más eficaces para el tratamiento de esta enfermedad.

Para el desarrollo del método analítico, en este trabajo fueron seleccionados antimicrobianos que han presentado una notable actividad contra aislados de *Nocardia brasiliensis*: linezolid, amoxicilina-ácido clavulánico, garenoxacina, además de los antimicrobianos del esquema tradicional amikacina y sulfametoxazol-trimetoprim. Se trabajó en plasma y tejido de ratón, ya que éste será el modelo experimental en el cual serán administrados estos antimicrobianos, o en diferentes combinaciones. Cabe mencionar que, durante el desarrollo del presente trabajo, fueron desarrollados métodos que permitieron la medición de otros antimicrobianos

de reciente estudio y que ha sido demostrada su elevada actividad contra *Nocardia brasiliensis*. Estos antimicrobianos son la gatifloxacina y la oxazolidinona DA-7867 (Vera-Cabrera 2003).

1.3 Características de los antimicrobianos propuestos para el tratamiento de actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis*

Los antibióticos son metabolitos microbianos o análogos sintéticos que, en pequeñas dosis, inhiben el crecimiento y supervivencia de microorganismos, sin causar toxicidad al huésped. Ejemplos de ellos son las penicilinas y las tetraciclinas. Los antibióticos son los medicamentos más frecuentemente prescritos en la actualidad, sin embargo, su efectividad puede verse disminuida por el desarrollo de resistencia de los microorganismos a estos agentes. En muchos casos, la utilidad clínica de los antibióticos naturales ha sido superada a través de manipulación química de la estructura original, logrando un espectro antimicrobiano más amplio, una mayor potencia, menor toxicidad y una administración más conveniente. Ejemplos de estos antibióticos semisintéticos son la amoxicilina y la doxiciclina. Las sustancias sintéticas no relacionadas con los productos naturales que inhiben o causan la muerte de los microorganismos son referidas como agentes **antimicrobianos** (Gringauz 1997).

1.3.1 Amikacina (sulfato de amikacina)

Su fórmula estructural es la siguiente:

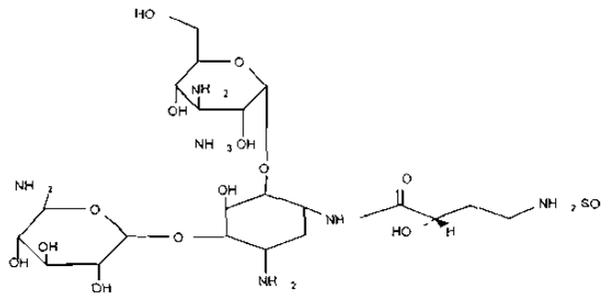


Figura 3. Estructura química del sulfato de amikacina

Nombre químico: sulfato de (S)-O-3-Amino-3-desoxi- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-(6-amino-6-desoxi- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6))-N³-(4-amino-L-2-hidroxitiril)-2-desoxi-L-estreptamina.

Fórmula molecular: $C_{22}H_{43}N_5O_{13} \cdot 2H_2SO_4$

Peso molecular: 717 g/mol

La amikacina pertenece al grupo de los aminoglicósidos. Es un polvo blanco a amarillo claro, amorfo o cristalino. Es muy soluble en agua; muy poco soluble en metanol, acetona, éter dietílico y cloroformo (Index Merk, 2001).

Mecanismo de acción

Los aminoglicósidos son bactericidas rápidos. La destrucción bacteriana depende de la concentración: cuanto más alta es, mayor la rapidez con que destruye microorganismos. También es característica de los aminoglicósidos una actividad bactericida residual, que persiste después de disminuir la concentración sérica a menos de la concentración inhibitoria mínima.

Espectro antibacteriano:

Tiene actividad *in vitro* contra *Pseudomonas spp*, *Escherichi coli*, *Proteus spp*, *Providencia spp*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Acinetobacter spp*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus spp*.

Absorción, distribución y excreción:

Los aminoglicósidos son cationes fuertemente polares, por ello su absorción es muy escasa en las vías gastrointestinales. Se absorben con rapidez en los sitios de inyección intramuscular. Las concentraciones máximas en plasma se alcanzan después de 30 a 90 minutos de la administración. Por su naturaleza polar no penetran con facilidad en las células del sistema nervioso central y ojo. Las concentraciones en secreciones y tejidos son pequeñas. Se excretan casi por completo, sin metabolizar, por filtración glomerular y se alcanzan concentraciones de 50 a 200 $\mu\text{g/mL}$ en orina. Una fracción grande de la dosis parenteral se excreta intacta en las primeras 24 horas; la mayor parte de ellas aparece en orina en las primeras 12 horas. Las vidas medias de los aminoglucósidos en plasma son semejantes y varían de 2 a 3 horas en individuos con función renal normal.

La dosis recomendada de amikacina es de 15 mg/kg/día en una sola dosis o en dos o tres fracciones iguales. La amikacina se absorbe con rapidez después de una aplicación intramuscular, y luego de inyectar 7.5 mg/kg de peso, las concentraciones máximas en plasma se acercan a 20 $\mu\text{g/mL}$. La concentración 12 horas después de una dosis de 7.5 mg/kg es de 5 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

Usos

El sulfato de amikacina está indicado en el tratamiento de las infecciones del aparato respiratorio bajo, del aparato genitourinario, de huesos y articulaciones, del sistema nervioso central, de piel y tejidos blandos, así como de infecciones intrabdominales, septicemia, bacteremias y quemaduras e infecciones postoperatorias producidas por bacterias gramnegativas sensibles (Godman 2003).

Actividad en contra de Nocardia

En el 2004, al evaluar la actividad de varios antimicrobianos contra *Nocardia brasiliensis*, Gómez y colaboradores reportaron para la amikacina una MIC₅₀ de 2 µg/mL y MIC₉₀ de 4 µg/mL (Gómez-Flores 2004).

1.3.2 Amoxicilina-Ácido Clavulánico

Amoxicilina:

La fórmula estructural de este antimicrobiano es la siguiente:

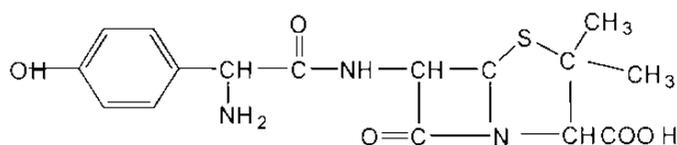


Figura 4. Estructura química de la amoxicilina

Fórmula molecular: C₁₆H₁₉N₃O₅S

Nombre químico: 6- [(R)-2-amino-2-p-hidroxifenil] acetamida]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.2] heptano-2-ácido carboxílico.

Peso molecular: 365 g/mol

Es un polvo blanco, inoloro y cristalino y ligeramente soluble en agua. Tiene un pKa de 2.7 y 7 y un máximo de absorción de 229 nm en metanol (Index Merk).

Clavulanato de Potasio

Su fórmula estructural es la siguiente:

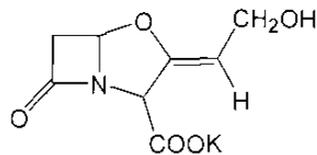


Figura 5 Estructura química del clavulanato de potasio

Fórmula molecular: $C_8H_9NO_5K$

Peso molecular: 238 g/mol

El clavulanato de potasio es un polvo cristalino, muy soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol a temperatura ambiente. Tiene un pKa de 2.7. Presenta un máximo de absorción a 270 nm cuando está disuelto en metanol:buffer de fosfatos (Index Merk, 2001)

Espectro antimicrobiano:

La combinación amoxicilina-clavulanato de potasio es activa *in vitro* en contra de organismos susceptibles a la amoxicilina sola y contra organismos productores de β -lactamasas, de bacterias aeróbicas grampositivas, gramnegativas y contra *Mycobacterium*.

Mecanismo de acción

La amoxicilina es una aminopenicilina y el ácido clavulánico es un inhibidor de β -lactamasa producido por fermentación de *Streptomyces clavuligerus*. Aunque el ácido clavulánico tiene una débil actividad antibacteriana cuando es utilizado solo, su uso combinado con ciertas penicilinas o cefalosporinas tiene un efecto bactericida sinérgico, esto debido a que el ácido clavulánico tiene una alta afinidad de unión a ciertas β -lactamasas que generalmente inactivan a la amoxicilina hidrolizando su anillo β -lactámico.

Absorción, distribución y excreción:

Ambos antimicrobianos son estables en presencia de las secreciones ácidas estomacales, y son bien absorbidos después de la administración oral. Se distribuyen en pulmones, líquido pleural y peritoneal. Pueden encontrarse en bajas concentraciones en esputo y saliva. Las concentraciones máximas alcanzadas en suero, después de la administración a un adulto de una dosis única de 250 mg de amoxicilina y 125 mg de ácido clavulánico, son alcanzadas de 1 a 2.5 horas y son, en promedio, de 3.7-4.8 $\mu\text{g/mL}$ y 2.2-3.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Usos:

La formulación amoxicilina-ácido clavulánico resulta una combinación con actividad antimicrobiana de amplio espectro. Es el antibiótico de elección para profilaxis quirúrgica y el tratamiento de infecciones posquirúrgicas, ginecológicas, ortopédicas y traumatológicas, infecciones intraabdominales e infecciones en piel y tejido blando, infecciones del tracto respiratorio inferior, infecciones del tracto urinario. También es eficaz en la terapéutica de otitis media en niños, sinusitis,

heridas por mordedura de animal, celulitis e infecciones en pies de diabéticos (Godman 2003).

Actividad en contra de Nocardia

Se ha observado un incremento en la sensibilidad de *Nocardia* cuando los antibióticos β -lactámicos han sido probados en combinación con inhibidores de la β -lactamasa. Este efecto ha sido particularmente observado en la combinación amoxicilina-ácido clavulánico. La combinación amoxicilina-acido clavulánico ha sido utilizada en el tratamiento de algunos casos de infección cutánea por *Nocardia brasiliensis* (Gómez-Flores 2004). Además, también ha sido demostrada la actividad *in vivo* de esta combinación administrada en el tratamiento de ratones BALB/c con actinomicetoma. La combinación amoxicilina-ácido clavulánico presentó actividad *in vitro* en contra de aislados de *N. brasiliensis* con una MIC₅₀ de 2 μ g/mL y una MIC₉₀ de 4 μ g/mL (Gómez-Flores 2004).

1.3.3 Garenoxacina

La fórmula estructural de este antimicrobiano es la siguiente:

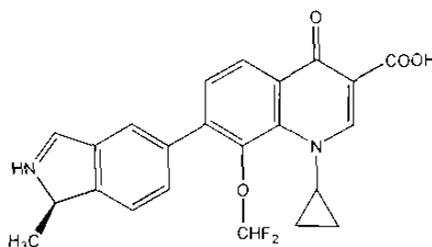


Figura 6. Estructura química de la garenoxacina.

La garenoxacina (BMS-284756 ó T-3811) es una nueva y única quinolona que, a diferencia de las otras quinolonas, no presenta flúor como sustituyente en la posición C-6 en el anillo quinolónico (Hayakawa 2003).

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las quinolonas es a través de la inhibición de la enzima DNA girasa, la cual es esencial para la replicación, transcripción y reparación del DNA bacterial (Godman 2003).

Espectro antimicrobiano:

Ha demostrado una excelente potencia particularmente en contra de bacterias grampositivas incluyendo estafilococos resistentes a meticilina y estreptococos resistentes a la penicilina, así como también actividad en contra de bacterias gramnegativas. También ha demostrado actividad en contra de *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium smegmatis* (Valera 2002).

Absorción, distribución y excreción:

Presenta excelente biodisponibilidad. Se han detrmnado concentraciones finales en suero y orina de pacientes de 2-10 µg/mL y 20-100 µg/mL respectivamente, después de una dosis de 600 mg (Ocaña, 2004). Aproximadamente 30 a 50% de la dosis administrada de garenoxacina se elimina por orina. En animales de experimentación se encontraron 2 principales metabolitos de la garenoxacina: el sulfato de garenoxacina (M1) y el glucurónido (M6); fueron encontrados en bilis (Hayakawa 2003).

Usos

La garenoxacina se utiliza en el tratamiento de infecciones respiratorias y de la piel.

Actividad contra *Nocardia brasiliensis*

Vera-Cabrera y colaboradores probaron la actividad de tres quinolonas: moxifloxacina, garenoxacina y gatifloxacina. De éstas, la garenoxacina fue la más activa, con una MIC₉₀ de 0.5 µg/mL (Vera-Cabrera 2004)

1.3.4 Linezolid

La fórmula estructural de este compuesto es la siguiente

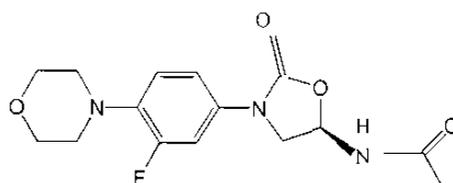


Figura 7. Estructura química del Linezolid.

Fórmula molecular: C₁₃H₁₅N₃O₄F

Nombre químico: (S)-(N)-[[3-[3-fluoro-4-(4morfonilil)feni]-2-oxo-5-oxazolidinyl] methyl]-acetamida (PNU-100766).

Peso molecular: 296 g/mol

Linezolid es una oxazolidinona sintética y un agente antimicrobiano que no está estructuralmente relacionado con ningún otro agente antimicrobiano. Presenta un máximo de absorción a 254 nm en metanol.

Espectro antibacteriano:

Linezolid es un agente bacteriostático en contra de enterococos y estafilococos, y bactericida en contra de estreptococos. Es activo *in vitro* y en infecciones clínicas contra *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, grupo *viridians* y *Pasteurella multocida* (Godman 2003).

Mecanismo de acción

Linezolid actúa inhibiendo el proceso bacteriano de síntesis de proteínas en el comienzo de la etapa de traducción, uniéndose al sitio 23S del RNA ribosomal de la subunidad 50S y previniendo la formación del complejo de iniciación 70S, el cual es un componente esencial en el proceso de traducción. Linezolid presenta este mecanismo único de acción con lo cual la posibilidad de observar reacción cruzada con otros medicamentos es mínima (Godman 2003).

Absorción, distribución y excreción:

Linezolid se absorbe después de la administración oral, tiene una biodisponibilidad de aproximadamente 100%. Las concentraciones séricas máximas son de 12-14 µg/mL dos horas después de una dosis única de 600 mg en adultos, y de alrededor de 20 µg/mL, con dosificación a 12 horas. La vida media es de aproximadamente 4 a 6 horas. Linezolid está unido a proteínas en un 31% y se distribuye ampliamente hacia tejidos bien irrigados, con un volumen de distribución de 0.6 a 0.7 L/kg (Godman 2003).

Es metabolizado por oxidación no enzimática a 2 metabolitos inactivos: ácido aminoetoxiacético e hidroxietilglicina. (Figura 8). Alrededor de 80% de linezolid aparece en la orina, 30% como compuesto activo y 50% como los dos metabolitos primarios.

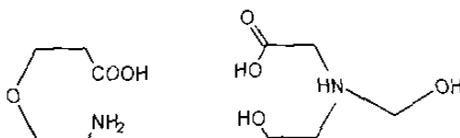


Figura 8. Principales metabolitos de Linezolid

Usos:

Linezolid está indicado para infecciones de piel y tejido blando, infecciones por enterococos y casos de neumonía.

Actividad contra Nocardia

Linezolid presenta un gran actividad *in vitro* en contra de cepas de *N. brasiliensis* (Gómez-Flores 2004). También ha sido demostrada su actividad *in vivo* ya que al administrar linezolid a 15 ratones infectados con actinomicetoma, solo dos de ellos presentaron el desarrollo de lesiones francas durante el transcurso normal de la enfermedad (Gómez-Flores 2004). La actividad de Linezolid en contra de aislados de *N. brasiliensis* determinada por el método de microdilución en placa fue reportada con una MIC₅₀ de 1 µg/mL y MIC₉₀ de 2 µg/mL (Gómez-Flores 2004).

1.3.5 Trimetoprim-Sulfametoxazol

Esta combinación se conoce en muchos países como *Cotrimoxazol*. El sulfametoxazol es una sulfonamida y el trimetoprim una diaminopirimidina. (Figuras 9 y 10).

Sulfametoxazol

La fórmula estructural de este compuesto es la siguiente

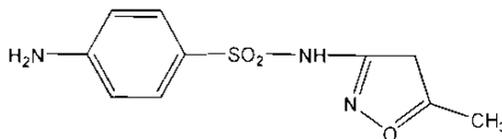


Figura 9. Estructura química del sulfametoxazol.

Fórmula molecular: $C_{10}H_{11}N_3O_3SN$

Nombre químico: 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil)bencensulfonamida.

Peso molecular: 253 g/mol

Es un polvo blanco casi insoluble en agua, en éter dietílico y en cloroformo, es fácilmente soluble en acetona y en soluciones diluidas de hidróxido de sodio; muy poco soluble en alcohol y muy soluble en dimetilformamida. Presenta un máximo de absorción a 269 nm en etanol (Index Merk, 2001).

Trimetoprim

La fórmula estructural de este compuesto es la siguiente

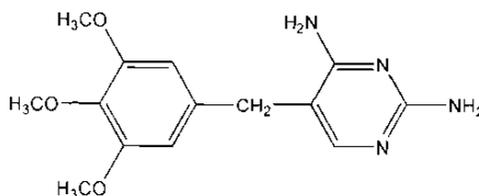


Figura 10. Estructura química del trimetoprim

Fórmula molecular: $C_{14}H_{18}N_4O_3$

Nombre químico: 2,4 diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina.

Peso molecular. 290 g/mol

Trimetoprim se presenta como cristales blancos, sin olor. Tiene un pK de 7.13 y presenta un máximo de absorbancia a 229 nm en metanol (Index Merk,2001).

Espectro antibacteriano:

La combinación sulfametoxazol-trimetoprim tiene una actividad bactericida de amplio espectro. Presenta actividad *in vitro* en contra de bacterias grampositivas, gramnegativas, bacterias anaerobias y protozoarios (Godman 2003).

Mecanismo de acción

La actividad antimicrobiana de la combinación sulfametoxazol-trimetoprim es consecuencia de su acción en dos fases de la vía enzimática en la síntesis del ácido tetrahidrofólico (figura 11). La sulfonamida inhibe la incorporación de PABA en el ácido fólico y el trimetoprim evita la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato. Esta última es la forma esencial de folato para las reacciones de transferencia de un solo carbono (Godman 2003).

La interacción sinérgica entre la sulfonamida y el trimetoprim se realiza gracias a una proporción óptima de las concentraciones de ambos, y es igual a la proporción de las concentraciones inhibitorias mínimas de cada uno por separado. La relación

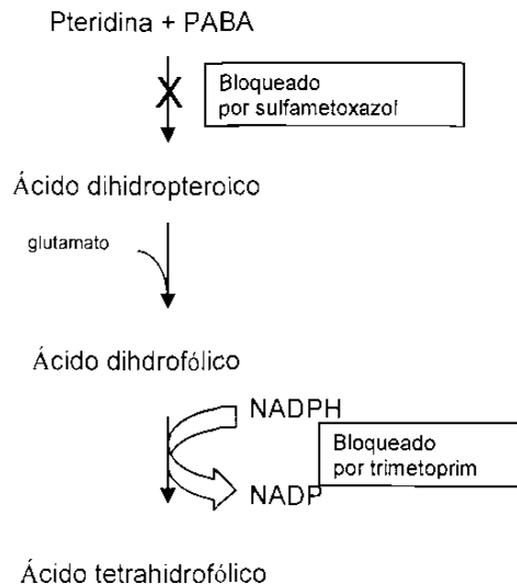


Figura 11. Etapas en el metabolismo de folato bloqueadas por sulfonamidas y trimetoprim

más eficaz para el máximo número de microorganismos es de 20 partes de sulfametoxazol con una parte de trimetoprim. De este modo, la combinación se prepara para alcanzar una concentración *in vivo* de sulfametoxazol 20 veces mayor que la de trimetoprim.

Absorción, distribución y excreción:

Los perfiles farmacocinéticos de sulfametoxazol y trimetoprim están estrechamente relacionados para alcanzar una proporción constante de 20:1 en sus concentraciones en sangre y tejido. Después de ingerir una sola dosis de la combinación, el trimetoprim se absorbe con mayor rapidez que el sulfametoxazol. En

término de dos horas se alcanzan cifras máximas de trimetoprim en sangre, en tanto que las de sulfametoxazol se logran en unas 4 horas. Las vidas medias son de alrededor de 11 y 10 horas respectivamente.

Cuando se administran 800 mg de sulfametoxazol con 160 mg de trimetoprim dos veces al día, las concentraciones máximas de ambos antimicrobianos en plasma alcanzan 40 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

El trimetoprim se distribuye y concentra rápidamente en tejidos, y en promedio 40% queda ligado a proteínas plasmáticas en presencia de sulfametoxazol. El volumen de distribución del trimetoprim es casi nueve veces mayor que el del sulfametoxazol. Trimetoprim-sulfametoxazol penetra fácilmente en líquido cefalorraquídeo y esputo; en bilis también se encuentran concentraciones considerables de cada componente. En promedio, 65% del sulfametoxazol está ligado a proteínas plasmáticas.

Aproximadamente 60% del trimetoprim y 25 a 50% del sulfametoxazol se excretan por la orina en término de 24 horas. La mayor parte del sulfametoxazol se elimina por acetilación y glucoronidación y, en menor proporción, por hidroxilación (Figura 12). También se excretan metabolitos del trimetoprim

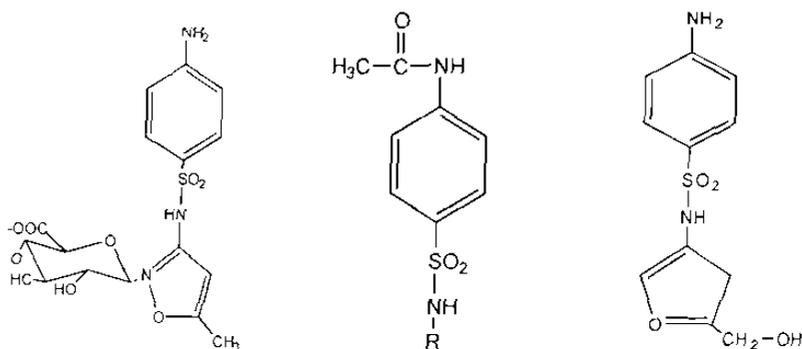


Figura 12. Metabolitos del sulfametoxazol

Usos:

La combinación trimetoprim-sulfametoxazol está indicada para el tratamiento de infecciones de la piel y tejidos blandos, en infecciones oculares, del sistema digestivo, infecciones agudas de las vías urinarias, de vías respiratorias superiores e inferiores, infecciones de oído, nariz y garganta, y de vías genitourinarias (Godman 2003).

Actividad contra *Nocardia*

La actividad de SXT en contra de aislados clínicos de *N. brasiliensis* determinada por el método de microdilución en placa es reportada por Gómez Flores con una MIC₅₀, en µg/mL, de 9.5/0.5 y MIC₉₀ de 9.5/0.05 (Gómez-Flores 2004).

1.4 Antecedentes

Diversos métodos analíticos y microbiológicos se han aplicado para la determinación de antimicrobianos en suero, plasma y otros fluidos biológicos; así como en tejido de animales y humanos. Entre los métodos analíticos que se han utilizado se encuentran la espectrofotometría de absorción UV-Vis, en algunos casos

empleando la espectrofotometría de derivadas, la espectrofluorometría, la cromatografía en capa fina, la resonancia magnética nuclear, la electroforesis capilar, entre otros (López-Martínez 2002, Cruces Blanco 1999, Agbaba, 1996, Connor, 1993, Pajchel, 2002). Entre todos ellos, el método que ha sido mayormente aplicado es la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) acoplada con diferentes detectores (DAD, fluorescencia, electroquímico o con un espectrómetro de masas) ya que esta técnica analítica se destaca por una alta sensibilidad, selectividad, exactitud, precisión y versatilidad (Skoog, 2001).

Todos los antimicrobianos incluidos en este estudio han sido determinados, en diferentes matrices, por diferentes métodos analíticos, en forma individual (linezolid, garenoxacina, amikacina) o en combinaciones (sulfametoxazol-trimetoprim, amoxicilina-ácido clavulánico). También se cuenta con referencias en donde se ha realizado la determinación de alguno de ellos, en forma simultánea, con otros agentes antimicrobianos (Pajchel, 2002, Connor 1993, Renew 2004).

1.4.1 Métodos analíticos para la determinación de antimicrobianos

1.4.1.1 Métodos para la determinación de amikacina

La amikacina es un antimicrobiano que pertenece al grupo de los aminoglicósidos. Estos han sido analizados en tejidos, en orina y suero por métodos microbiológicos, de radioinmunoensayo y radioenzimáticos, por cromatografía en papel, por cromatografía de gases y por cromatografía de líquidos de alta resolución con detectores de UV o de fluorescencia (Isoherranen 1999). Sin embargo, también se reporta que en los métodos microbiológicos y de inmunoensayo se han presentado

problemas de reacción cruzada con otros aminoglicósidos, debido a la estrecha semejanza estructural entre este grupo de antimicrobianos.

Debido a la naturaleza polar e iónica de estos compuestos, la separación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución empleando fase reversa se debe llevar a cabo utilizando buffer de acetato; el ión acetato actúa como contraión formando par iónico con el aminoglicósido (Isoherranen 1999). Por otro lado, ya que estos compuestos carecen de grupo cromóforo, deben ser derivatizados antes de la detección. De acuerdo al estudio de Isoherranen, los agentes derivatizantes más empleados para el caso de la amikacina han sido el ortoftaldehído/2 mercaptoetanol (OPA/2ME), el fluoro 2,4 dinitrobenceno (FDNB), el dinitrobencilcloruro (DNBC), el ácido 2,4,6 trinitrobencensulfónico (TNBS). Las columnas de separación empleadas han sido fase inversa C₈ o C₁₈ y las fases móviles constituidas por mezclas de buffers ácidos con metanol y acetonitrilo (Isoherranen 1999, Maitra 1978, Sánchez-Martínez 2004).

También ha sido reportado el uso de par iónico con detección electroquímica (Sánchez 2004). Este mismo trabajo reporta la determinación de amikacina por cromatografía micelar electrocinética con detección fluorométrica con un límite de cuantificación de 5 µg/mL. Sánchez reporta un método para la determinación de amikacina en suero utilizando indocianina y cerio como reactivos para derivatizar, con detección por fluorescencia (Sánchez 2004).

1.4.1.2 Métodos para la determinación de Amoxicilina-Ácido Clavulánico

En la mayor parte de las determinaciones de amoxicilina en diferentes matrices (tejido, suero, plasma y preparaciones farmacéuticas), se ha utilizado la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección por Ultravioleta o, mediante una derivatización, con detección por fluorescencia. La amoxicilina se ha determinado en forma individual, pero también en forma simultánea cuando se encuentra mezclada con metronidazol (Menelaou 1999), ampicilina, flucloxacilina y dicloxacilina (Mohamed 2001) ampicilina (Connor 1993) y ácido clavulánico (Hoizey 2002, Abounassif 1991, Foulstone 1982).

Otros métodos analíticos que se han empleado para la determinación de este antimicrobiano son la Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , (Connor 1993), la Espectrofotometría UV-Vis (Mohamed 2001) y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Espectrometría de Masas con Ionización termospray (De Baere 2002).

En las determinaciones por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) se han utilizado, como fase estacionaria, columnas de fase inversa C_8 o C_{18} . Para la elución se utilizaron como solventes orgánicos metanol o acetonitrilo y buffer de fosfatos como fase acuosa. Cabe mencionar que, mientras algunos autores refieren el uso de agentes para la formación de par iónico, otros mencionan el uso solo de solvente orgánico y buffer de fosfato a diferentes valores de pH. Los agentes empleados para la formación de par iónico han sido el cloruro de tetrabutilaminio a un pH de 2.5 (Hoizey 2002), el fosfato de tetrabutilamonio a un pH de 6.5, 7.6 y 7.1 (Krauwinkel 1993, Chulavatnatol 1993, Yuan 1995), el ácido metanosulfónico (Mascher 1998) y el dodecilsulfato de sodio a pH de 2.1 (Menelaou 1999).

La detección se ha realizado en la mayor parte por Ultravioleta, pero también se ha realizado derivatización con reactivos como Floram (Mascher 1998), fluorescamina (Lee 1978) y ácido tricloroacético con formaldehído (Wenhong 2000), para la detección por fluorescencia. Al utilizar fluorescencia se alcanzaron límites de detección de 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para tejido (Wenhong 2000) y de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en plasma (Mascher 1998), mientras que con detección por ultravioleta los límites reportados son desde 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Menelaou 1999, Yuan 1995)

1.4.1.3 Métodos para la determinación de Linezolid

Linezolid ha sido determinado en suero, plasma, orina, tejido, hueso y músculo de humanos (Borner 2001, Tobin 2001, Ehrlich 2001, Gee 2001, Lovering 2002) y en plasma de perro, rata, ratón y conejo (Peng 1999) por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de Fase Inversa con columnas C_8 o C_{18} . Para la elución se ha empleado como fase orgánica acetonitrilo y como fase acuosa buffer de acetato de sodio a pH 3.7, (Borner 2001) o con buffer de fosfato a pH 5 (Ehrlich 2001); buffer de fosfato con ácido heptanosulfónico como agente par iónico y como fase orgánica metanol (Tobin 2001), acetonitrilo al 20% en agua (Peng 1999) y una fase compuesta por ácido trifluoroacético con tetrahidrofurano, metanol y agua (Gee 2001).

La detección se ha llevado a cabo en todos los casos por Ultravioleta a longitudes de onda entre 254 a 260 nm (λ máxima del antimicrobiano). En suero, el límite de detección más bajo que se reporta es de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1.4.1.4 Métodos para la determinación de Garenoxacina

Para este antimicrobiano se han descrito determinaciones con la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Estas determinaciones se han llevado a cabo en suero de ratón (Xuan 2001) y en plasma de ratas, perros y monos (Hayakawa 2003). Xuan y colaboradores llevaron a cabo la determinación de garenoxacina por cromatografía de par iónico en una columna Nucleosil 100 C₁₈ con una fase móvil compuesta por acetonitrilo-buffer de fosfatos 0.01 M con 0.01 M de fosfato de tetrabutilamonio como reactivo de par iónico. La detección se realizó por fluorescencia a una λ de excitación de 290 nm y una λ de emisión de 418 nm y se trabajó en un intervalo de 0.2 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Hayakawa y colaboradores utilizaron una columna también de fase inversa y como fase móvil acetonitrilo con buffer de citrato 0.2 M a un pH de 3.5 y una detección por UV a 280 nm (λ de máxima absorción para el antimicrobiano). El intervalo de trabajo fue de 0.03 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

La garenoxacina también ha sido determinada por fluorescencia incrementada por un medio micelar y en presencia de terbio (Ocaña 2003).

1.4.1.5 Métodos para la determinación de sulfametoxazol-trimetoprim

Esta mezcla ha sido determinada en productos farmacéuticos por Espectrofotometría de derivadas (López Martínez 2002), por Espectrofluorometría (Cruces-Blanco 1999) y por Cromatografía en Capa Fina (Agbaba 1996). La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ha sido empleada para la determinación de esta mezcla en animales y en humanos (Vree 1978, Mutabingwa 1999, Elmas 2000), y en aguas residuales (Renew 2004). También se ha encontrado literatura en donde se han determinado en forma individual el sulfametoxazol en leche (Mahedero 2001) y el trimetoprim en tejido (Brandsteterova 1996).

En suero de humano se ha determinado esta mezcla por CLAR utilizando para la separación una columna analítica de fase inversa y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo: buffer de Sörensen (Mezcla de NaH_2PO_4 0.06 M/ K_2HPO_4 0.06 M) 0.02 M a pH de 3 (25:75). La detección se realizó por ultravioleta a 235 nm y los límites de detección en suero reportados son 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$ de trimetoprim y sulfametoxazol respectivamente (Dudley 1984).

1.4.2 Tratamiento previo de la muestra

Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben ser eliminadas antes de ser analizadas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para evitar que precipiten dentro del equipo cromatográfico. Este paso de limpieza de la muestra puede llevarse a cabo por un proceso de precipitación, o aplicando el método de extracción en fase sólida.

1.4.2.1 Desproteínización.

La desproteínización se realiza con la adición de un agente precipitante, entre ellos solventes orgánicos, sales, ácidos, o bien por ultrafiltración. Cada uno de estos agentes precipitantes se añade en una proporción que depende del volumen de muestra empleado (suero o plasma) así como también de las propiedades de cada uno de estos agentes: cuanto menor sea la polaridad del solvente orgánico agregado mejor será su capacidad de desproteínización. En el caso de los ácidos, éstos forman sales insolubles con las proteínas cargadas positivamente, sin embargo, debido a la elevada acidez, en algunos casos puede llegar a ocurrir alteraciones de la muestra. En ciertos casos, durante la precipitación puede producirse una pérdida del analito por

adsorción al precipitado, lo que ocasiona bajos porcentajes de recuperación. Este efecto puede minimizarse controlando adecuadamente las condiciones en que se realiza la desproteinización y añadiendo la solución muestra al agente desproteinizante y no a la inversa (Quattrocchi 1992).

1.4.2.2 Extracción en fase sólida

Este método consiste en una extracción líquido-sólido a través de una columna o cartucho de plástico el cual está relleno con materiales similares a los empleados para el relleno de las columnas de cromatografía. Estos rellenos pueden ser adsorbentes muy polares, como la sílica, hasta muy poco polares como los C₁₈. También pueden ser materiales de intercambio iónico o polímeros. Las sustancias neutras, no polares, se retienen de vehículos polares en columnas no polares tipo C₈ y C₁₈, estas columnas se lavan con mezclas de agua:solvente orgánico y los analitos se eluyen con algún solvente orgánico. Para análisis en suero o plasma de algunos antibióticos o compuestos activos, los cartuchos que se han utilizado son C₈ y C₁₈ (Quattrocchi 1992).

En el caso de la determinación de antimicrobianos en muestras biológicas (suero, plasma, tejido muscular y hueso) han sido aplicadas tanto la precipitación de proteínas como la extracción en fase sólida.

1.4.2.3 Análisis de antimicrobianos en fluidos biológicos

Para linezolid, garenoxacina, y amoxicilina, diferentes solventes se ha utilizado para la precipitación de proteínas en plasma, suero u orina, entre ellos el acetonitrilo (Tobin 2001, Xuan 2001), el ácido trifluoroacético, el ácido perclórico (Borner 2001,

Mascher 1998), y el metanol (Hoizey, 2002). Borner reporta que la precipitación debe realizarse consumiendo el menor tiempo posible ya que el antimicrobiano en estudio (amoxicilina) sufre degradación en medio fuertemente ácido (Borner 2001).

Por otro lado, en otros reportes de determinación de linezolid y de amoxicilina, se ha empleado la extracción en fase sólida, con cartuchos de extracción de fase inversa C₁₈, cartuchos C₂ (Gee, 2001, Peng, 1999, Yuan, 1995) C8 (Lee, 1984, Krawinkel, 1993). En todos los casos se reportan porcentajes de recuperación entre 95 y 100% con coeficientes de variación de los métodos inferiores al 15%.

1.4.2.4 Análisis de antimicrobianos en Tejido (músculo)

En el caso de análisis de antimicrobianos en tejido, primero se lleva a cabo una extracción de los analitos de la matriz tejido por agitación constante durante un tiempo, el cual es variable de acuerdo a los autores (Brandsteterova, 1996, Baere 2002, Kutscha-Lissberg, 2003) seguido por una precipitación de proteínas y una filtración (Kutscha-Lissberg, 2003); pero también se reporta el uso de extracción en fase sólida (Brandsteterova, 1996, Baere 2002). En todos los casos, las recuperaciones obtenidas han sido mayores del 95%.

1.5 Justificación

En la actualidad no se cuenta con métodos analíticos que permitan la determinación simultánea de los antimicrobianos incluidos en este estudio. El desarrollo de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución con este objetivo, permitirá la determinación de niveles plasmáticos para el estudio de la farmacocinética de los antimicrobianos cuando son administrados solos, o en mezclas; así como para establecer la deposición de los mismos en tejido infectado.

Conocer estos parámetros ayudará al estudio y selección de nuevos esquemas en el tratamiento de actinomicetoma.

1.6 Objetivo General

Desarrollar y validar métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución con detectores UV y Fluorescencia para la determinación simultánea de los antimicrobianos sulfametoxazol, trimetoprim, linezolid, garenoxacina, amoxicilina, amikacina y ácido clavulánico en plasma de ratón y en tejido de ratón infectado con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

1.7 Objetivos Específicos

- 1.- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación simultánea de los antimicrobianos sulfametoxazol-trimetoprim, amoxicilina-ácido clavulánico linezolid, garenoxacina y amikacina
- 2.- Desarrollar la metodología para la extracción de estos agentes de plasma de ratón y tejido de ratón infectado con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*
- 3.- Validar los métodos analíticos desarrollados en ambas matrices
- 4.- Verificar la utilidad de los métodos desarrollados aplicándolos en la cuantificación de estos agentes en muestras de plasma y tejido infectado de ratones infectados con actinomicetoma y tratados con los antimicrobianos anteriormente descritos

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipos

- Cromatógrafo de Líquidos Analítico Waters 2690 Alliance, con detectores UV-Visible de Arreglo de diodos modelo 996 y Espectrofluorómetro modelo 474
- Balanza Analítica A&D GR-120
- Microcentrífuga eppendorf Centrifuge 5415C
- Baño de agua con sonicador FS 20 Fisher Scientific
- Vortex Mini Vortexer VWR Scientific Products
- Centrífuga Eppendorf 5810R
- Campana NUAIRE Cabinets Biological Safety modelo NONU425400 Clase II A/B3
- Potenciómetro EA 90 con electrodo de vidrio para la medición de pH
- Horno para control de temperatura de columna cromatográfica. Metachem technologies Inc.

2.2 Materiales

- Columna Hypersil ODS (100 x 2.1 mm DI, 5 μm de tamaño de partícula)
Agilent
- Columna X-Terra RP C₁₈ (100 x 2.1 mm DI, 5 μm de tamaño de partícula)
Waters
- Columna Atlantis dC₁₈ (150 x 4.6 mm DI, 5 μm de tamaño de partícula)
Waters
- Guardacolumna Symetry C₁₈ Waters
- Tubos eppendorf 1.5 mL
- Tubos cónicos de 5 y 10 mL
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Matraces de aforación de 10 mL
- Pipetas automáticas de 10 a 100 μL y de 100 a 1000 μL Brand
- Puntillas
- Guantes para cirujano # 7
- Jeringas desechables de 5 mL
- Filtros de Nylon 0.45 μm y diámetro de 13 mm Waters
- Filtros para HPLC de nylon para solventes (13 x 47 mm, 0.45 μm) y para muestras (acrodiscos de Nylon de 0.45 μm) Waters Corporation
- Insertos de capacidad de 150 μL Waters Corporation
- Viales para cromatógrafo Waters Corporation

2.3 Reactivos

- Amoxicilina *Sigma Aldrich*
- Ácido Clavulánico *Sigma Aldrich*
- Garenoxacina *Bristol Myers Squibb*
- Linezolid. *Pharmacia and Upjohn*
- Amikacina *Sigma Aldrich*
- Sulfametoxazol *Sigma Aldrich*
- Trimetoprim *Sigma Aldrich*
- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Acido Trifluoroacético *Sigma Aldrich*
- Agua grado HPLC
- Fosfato de tetrabutilamonio *Baker Analyzed*
- Fosfato de potasio dibásico *Fermont*
- Ácido fosfórico 85% *Baker*
- Trietilamina *Fisher Scientific*
- Ácido Acético ACS *Fermont*
- Ortoftaldehído. *Sigma Aldrich*
- 2-Mercaptoetanol. *Sigma Aldrich*
- Tetraborato de sodio. *Fermont*

2.4 Métodos

2.4.1 Preparación de soluciones

El agua utilizada en la preparación de todos los reactivos fue grado HPLC

2.4.1.1 Reactivos

Buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.2

Se pesaron 0.8709 g de fosfato de potasio dibásico y se disolvieron en 400 mL de agua. Se ajustó el pH de esta solución a 7.2 con ácido fosfórico al 21% v/v. Una vez ajustado la solución se aforó a 500 mL y se filtró a través de filtros de Nylon de 0.45 μm .

Buffer de fosfatos 0.01 M pH 4

Se pesaron 0.6 g de fosfato de sodio diácido y se disolvieron en 400 mL de agua. Se ajustó el pH de esta solución a 4. Una vez ajustado el pH la solución se aforó a 500 mL y se filtró a través de filtros de Nylon de 0.45 μm .

Ácido Trifluoroacético 0.1 %

A un matraz de aforación de capacidad de 1000 mL que contenía 600 mL de agua se añadió 1 mL de ácido trifluoroacético. Se mezcló y se llevó a volumen final con agua. La solución (fase móvil A del sistema 5) se filtró a través de filtros de Nylon de 0.45 μm y se almacenó en frasco de vidrio oscuro y en refrigeración hasta su uso.

Trietilamina 0.3% pH 4

Se disolvieron 3 mL de trietilamina en 600 mL de agua. La solución se mezcló y se ajustó el pH de la misma a 4 con ácido acético glacial 3 M. Se mezcló y se llevó a aforación a un volumen de 1000 mL. La solución (fase móvil A, sistema 1) se filtró a través de filtros de Nylon de 0.45 μm y se almacenó en frasco de vidrio oscuro y en refrigeración hasta su uso.

Buffer de boratos.

Se preparó una solución saturada de tetraborato de sodio en agua y se ajustó el pH de la solución a 9 con NaOH 3 N.

Reactivo de derivatización

Se diluyeron 250 mg de ortoformaldehído en 10 mL de metanol. De esta solución se tomó 1 mL, se añadió 1 mL de metanol y 50 μL de 2-mercaptoetanol y se completó a 5 mL con 2.95 mL de solución saturada de borato de sodio a pH 9.

2.4.1.2 Estándares

Estándares individuales de antimicrobianos

Se pesaron 10 mg de cada uno de los antimicrobianos: amoxicilina, trimetoprim linezolid, sulfametoxazol, y garenoxacina y se disolvieron en metanol. Amikacina y ácido clavulánico se disolvieron en agua. Las soluciones fueron aforadas a 10 mL. La concentración de cada estándar fue de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Mezcla de antimicrobianos

Se prepararon mezclas de los antimicrobianos a 3 diferentes concentraciones: 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Mezcla 1: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Se tomó 1 mL de cada uno de las soluciones estándar y se colocó en un matraz de 10 mL. Se llevó a un volumen de 10 mL utilizando buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.2.

Mezcla 2: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Se tomaron 100 μL de cada estándar y se colocaron en un matraz de aforación de 10 mL. Se llevó a la marca utilizando buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.2.

Mezcla 3: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Se tomaron 10 μL de cada estándar y se colocaron en un matraz de aforación de 10 mL. Se llevó a la marca utilizando buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.2. La concentración de esta mezcla fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.4.2 Condiciones cromatográficas

En la tabla V se resumen las condiciones cromatográficas que fueron probadas durante el desarrollo del método hasta lograr la resolución de todos ellos. Al final, el sistema que nos permitió resolver 5 de los antimicrobianos propuestos fue el seleccionado para continuar con el siguiente punto.

Una vez que se estableció el sistema cromatográfico se procedió a optimizarlo probando diferentes programas de gradiente de elución (Tabla VI).

TABLA V
CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PROBADAS DURANTE EL
DESARROLLO DEL MÉTODO

Sistema cromatográfico	Fase Estacionaria	Fase Móvil	Flujo mL/min
1	C ₁₈ 100 x 2.1 mm y 5 µm tp	Agua con TEA 0.3%: Acetonitrilo pH 4 (73/27)	0.4
2	C ₁₈ 100 x 2.1 mm y 5µm tp	Buffer de fosfato 0.005 M pH 7: Metanol (94:6)	0.4
3	C ₁₈ 100 x 2.1 mm y 5µm tp	Buffer de fosfato pH 0.015 M pH 7 con TBA** 0.01 M (90:10)	0.4
4	C ₁₈ polimérica XTerra 100 x 2.1 mm y 5 µm tp	Buffer de fosfato pH 0.015 M pH 7 con TBA 0.01 M (90:10)	0.4
5	Atlantis dC ₁₈ 150 x 4.6 mm y 5 µm de tp	TFA*** 0.1%: Acetonitrilo (elución en gradiente)	1

- Trietilamina ** Fosfato de Tetrabutilamonio *** Acido trifluoroacético

2.4.3 Optimización del sistema

A partir del cromatograma obtenido se evaluaron los parámetros de eficiencia: factor de selectividad, factor de capacidad, resolución y número de platos teóricos. Se

seleccionó el programa en donde los resultados obtenidos fueron los más cercanos al valor óptimo.

TABLA VI
PROGRAMAS DE GRADIENTE DE ELUCIÓN UTILIZADOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Programa 1			Programa 2			Programa 3		
Tiempo minutos	% ATF*	% AC	Tiempo minutos	% ATF*	% ACN	Tiempo minutos	% ATF*	% ACN
1	87	13				1	92	8
4	87	13	4	90	10	4	92	8
10	78	22	14	77	23	14	77	23
16	78	22	24	77	23	24	77	23
17	75	25	26	90	10	26	92	8
21	75	25	29	90	10	30	92	8
22	87	13						
24	87	13						

*Ácido Trifluoroacético al 0.1%. **ACN = Acetonitrilo. En todos los casos flujo de 1 mL/min y temperatura 30°C.

El cálculo de los parámetros se realizó evaluando los siguientes parámetros:

a) Factor de selectividad

Se representa como α y su valor óptimo es 1.2. Para cada par de compuestos adyacentes se calculó de la siguiente manera:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde

t_{R2} y t_{R1} representan el tiempo de retención del compuesto 2 y del compuesto 1 respectivamente

t_0 es el tiempo muerto

b) Factor de capacidad

Se representa como k' y su valor óptimo es entre 2 y 10. Se calculó de la siguiente manera:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (\text{ecuación 2})$$

donde

t_R y t_0 representan el tiempo de retención en minutos del compuesto de interés y el tiempo muerto respectivamente. Este parámetro se determinó para cada compuesto.

c) Resolución

Se representa como R y su valor óptimo es 1.5 o mayor. Se calculó de la siguiente manera:

$$R = \frac{2 \left[t_{R2} - t_{R1} \right]}{W_2 + W_1} \quad (\text{ecuación 3})$$

donde

t_{R1} y t_{R2} son los tiempos de retención en minutos de 2 compuestos adyacentes.

W_1 y W_2 representan el ancho del pico en su base, en minutos, de los compuestos 1 y 2 respectivamente

d) Número de platos teóricos

Los platos teóricos representan la eficacia del sistema cromatográfico. Para cada componente se calcularon de la siguiente manera:

$$N = \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (\text{ecuación 4})$$

A mayor número de platos teóricos es mayor la eficiencia

2.4.4 Validación del sistema cromatográfico

La validación se llevó a cabo con los parámetros establecidos por la FDA en el documento Guía para la Industria. Validación de Métodos Bioanalíticos (Guía de Validación de la FDA 2001). Fueron evaluados los siguientes parámetros

2.4.4.1 Linealidad

Se prepararon soluciones estándar de concentraciones de 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de la mezcla de antimicrobianos de 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las curvas de calibración se prepararon tomando diferentes volúmenes de la mezcla y completando a 1500 μL con la solución buffer de fosfatos 0.01 M a pH 7.2. Todas las soluciones estándar se prepararon por triplicado para construir tres curvas de calibración. Se utilizó el programa Excel para obtener la ecuación de la recta. Para establecer el intervalo lineal se evaluó el coeficiente de regresión y el coeficiente de variación de los factores de respuesta, el cual fue calculado de la siguiente manera:

$$FR = \text{Respuesta} / \text{Concentración} \quad (\text{ecuación 5})$$

donde:

Respuesta es el parámetro que se midió y que es proporcional a la concentración: se consideró el área de pico cromatográfico

Concentración es la concentración de la solución de cada una de las soluciones que se analizaron.

El coeficiente de variación se calculó como

$$\text{Coeficiente de variación} = (\bar{X}/ds)*100 \quad (\text{ecuación 6})$$

donde

\bar{X} representa la media de las mediciones

ds es la desviación estándar obtenida de estas tres mediciones

2.4.4.2 Límite de detección

El límite de detección se calculó en base a la desviación estándar de la respuesta y la pendiente:

$$LD = \frac{3,3ds}{m} \quad (\text{ecuación 7})$$

donde:

ds es la desviación estándar de la señal (respuesta) del blanco

m es la pendiente de la curva de calibración (European Agency 1996)

2.4.5.3 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación para el sistema cromatográfico fue evaluado de dos maneras:

a) en base a la desviación estándar de la respuesta y la pendiente:

$$LC = \frac{10ds}{m} \quad (\text{ecuación 8})$$

donde:

ds es la desviación estándar de la señal (respuesta) del blanco

m es la pendiente de la curva de calibración (European Agency 1996)

b) como la concentración mas baja de la curva de calibración que presentó al menos 5 veces la señal del blanco y que tenga una respuesta identificable, y reproducible con una precisión menor del 20% (Guía de validación de la FDA 2001)

2.4.4.4 Precisión Intradía e Interdía

La precisión del sistema fue determinada inyectando 5 veces la mezcla de estándares de las concentraciones de 0.3, 5 y 10 µg/mL y evaluando los coeficiente de variación para cada nivel de concentración. La precisión interdía se evaluó inyectando estos estándares en 3 días diferentes. Con los datos obtenidos de los cromatogramas se procedió a calcular el coeficiente de variación de la respuesta obtenida con las ecuaciones anteriormente descritas. Los valores fueron calculados a partir del área de pico cromatográfico.

2.4.4.5 Robustez

Para probar la robustez del método se utilizó un diseño experimental de Plackett y Burman para 7 variables (Quattrocchi, 1992). El diseño experimental propuesto se muestra en la tabla VII. Las variables en consideración fueron: la temperatura, el flujo, el % de ácido trifluoroacético (TFA), el % de acetonitrilo, el volumen de inyección y la composición del solvente de la muestra. En el caso de los analitos que

presentaron fluorescencia también se incluyó la modificación en las longitudes de onda de emisión y de excitación. Para todos los casos el parámetro a evaluar fue el tiempo de retención.

TABLA VII
DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR ROBUSTEZ.

Variable	Experimento								
	0*	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura (°C) (A)	30°C	32	32	32	32	28	28	28	32
Flujo (mL/min) (B)	1 mL/min	1,2	1,2	0.8	0.8	1,2	1,2	0.8	1,2
ATF (%) (C)	0.1%	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5	1.5
Acetonitrilo (%) (D)	8%	10	10	6	6	6	6	10	10
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm) (E)	282/392*	294/394	290/390	294/394	290/390	290/390	294/394	290/390	294/394
	292/408*	294/310	290/306	294/310	290/306	290/306	294/310	290/306	294/310
Vol. de inyección (µL) (F)	10µL	15	5	5	15	15	5	15	15
Solvente de la mezcla (G)	Buffer fosfatos	ATF	ACN	ATF	ACN	ACN	ATF	ACN	ATF
Resultado (t _R)		s	t	u	v	w	x	y	z

* el experimento 0 corresponde al método optimizado

El cálculo de las diferencias de las medias para cada parámetro (V_i), en forma individual, se realizó de la siguiente manera:

$$V_A = \frac{1}{4}(s+t+u+v) - \frac{1}{4}(w+x+y+z)$$

$$V_B = \frac{1}{4}(s+t+w+x) - \frac{1}{4}(u+v+y+z)$$

$$V_C = \frac{1}{4}(s+u+w+y) - \frac{1}{4}(t+v+x+z)$$

$$V_D = \frac{1}{4}(s+t+y+z) - \frac{1}{4}(u+v+w+x)$$

$$V_E = \frac{1}{4}(s+u+x+z) - \frac{1}{4}(t+v+w+y)$$

$$V_F = \frac{1}{4}(s+v+w+z) - \frac{1}{4}(t+u+x+y)$$

$$V_G = \frac{1}{4}(s+v+x+y) - \frac{1}{4}(t+u+w+z)$$

154705

Los resultados fueron evaluados empleando la siguiente ecuación:

Si $|V_i| > ds \cdot 2^{1/2}$ la diferencia es significativa. (ecuación 9)

donde:

V_i es la diferencia de las medias de los t_R obtenidos de los valores altos y bajos para cada parámetro en particular

ds es la desviación estándar resultado del análisis de precisión para los tiempos de retención.

El número 2 es una constante que se refiere al nivel de confiabilidad en el análisis de varianza igual a 95%

El análisis se realizó para cada uno de los compuestos en estudio

2.4.4.6 Estabilidad de la mezcla

Alícuotas de la mezcla de antimicrobianos se almacenaron en refrigeración a 4 °C, y en congelación, y fueron analizadas periódicamente. Las señales obtenidas fueron graficadas en una carta control en la que se establecieron como límites ± 2 desviaciones estándar obtenidas del estudio de la precisión (Harvey 2002).

2.4.5 Métodos de tratamiento de muestra

Como tratamiento previo para el análisis de antimicrobianos en las muestras biológicas se realizó el método de desproteínización.

2.4.5.1 Elección del solvente de desproteínización

Para la desproteínización se probaron tres solventes: metanol, acetonitrilo y ácido trifluoroacético. Se realizó el procedimiento de precipitación de proteínas de plasma por triplicado. Los tres solventes se añadieron en la misma proporción en relación con el plasma (1:4). Con los resultados obtenidos se evaluó el % de

recuperación y el % de reproducibilidad. Este procedimiento se realizó por triplicado. Se aplicó la prueba estadística de ANOVA para evaluar diferencia significativa entre los resultados obtenidos (Marques de Cantú, 1990)

Las proteínas de las muestras de tejido fueron precipitadas con acetonitrilo en dos procedimientos consecutivos: el primero con una proporción 1:1,5 y el segundo 1:1 con respecto al volumen de buffer que fue utilizado para disolver la muestra de tejido.

2.4.5.2 Elección del volumen del plasma

Se probaron dos volúmenes de plasma para extraer: 50 y 100 μL . Se tomaron las alícuotas de plasma y se colocaron en tubos Eppendorf. A cada una de ellos se adicionó un volumen de mezcla de antimicrobianos para obtener una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se agitó la solución, y posteriormente se añadieron 200 μL de acetonitrilo. Se agitó en vortex 10 segundos. Se dejó reposar durante 5 minutos y posteriormente se centrifugaron a 5304 g durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró a través de acrodiscos de 0.45 μm . El filtrado se analizó por CLAR. Este procedimiento se realizó por triplicado. A partir de los resultados obtenidos de los cromatogramas se evaluó el % de recuperación y la precisión (RSD) del procedimiento. Los datos obtenidos fueron comparados: se utilizó la prueba estadística F para evaluar diferencia significativa:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (\text{ecuación 10})$$

donde S_1^2 (varianza) es mayor que S_2^2 y los grados de libertad son N-1. Si el valor calculado de F excede del valor de la tabla, al grado de confianza seleccionado (95% en este caso) la diferencia entre las varianzas de ambos métodos es significativa (Christian 1994).

2.4.6 Desarrollo del método

2.4.6.1 Plasma

Se trabajó con un pool de plasma de ratón que se preparó mezclando diferentes muestras de plasma. El pool fue mantenido a -20°C hasta el momento de su análisis. El pool de plasma se descongeló hasta alcanzar temperatura ambiente, se tomaron diferentes alícuotas de $50\ \mu\text{L}$ y se colocaron en tubos eppendorf. A estas alícuotas se añadieron diferentes volúmenes de la mezcla de antimicrobianos de 1, 10 y $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ para obtener concentraciones finales de 0.6, 5 y $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ y se llevaron a un volumen de $200\ \mu\text{L}$ con buffer de fosfatos pH 7.2. A estas soluciones se añadieron $200\ \mu\text{L}$ de acetonitrilo para precipitar las proteínas. Las mezclas se agitaron en vortex durante 10 segundos y se centrifugaron en microcentrífuga a $5304g$ durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró con acrodiscos de Nylon de $0.45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Los filtrados se recibieron directamente en viales para cromatografía con insertos de capacidad de $150\ \mu\text{L}$.

2.4.6.2 Tejido de ratón infectado con actinomicetoma

Las muestras de tejido se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento, que se llevó a cabo de la siguiente manera: se descongelaron las muestras de tejido hasta alcanzar temperatura ambiente. Se removió la piel y el hueso, y todo el tejido fue

mezclado mecánicamente hasta obtener una masa homogénea. Se tomaron alícuotas de tejido de entre 0.1 a 0.3 g y se colocaron en tubos cónicos de 15 mL de capacidad. Estas alícuotas de tejido fueron fortificadas con diferentes volúmenes de las soluciones de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ para obtener concentraciones finales de 0.4, 2 y 8 $\mu\text{g/mL}$. El tejido se dejó reposar durante 45 minutos para después añadir 2 mL de buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.2. Se homogenizó con agitación vortex durante 2 minutos. Enseguida se añadieron 3 mL de acetonitrilo para precipitar proteínas y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se colocaron 300 μL del sobrenadante en un tubo eppendorf y se añadieron 300 μL de acetonitrilo para asegurar la precipitación total de las proteínas, se centrifugó nuevamente a 5304g durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró a través de acrodiscos de Nylon de 0.45 μm de tamaño de poro para después analizarlo por CLAR. Para la manipulación de estas muestras de tejido se trabajó en una campana de seguridad, utilizando protección personal (guantes y cubrebocas).

2.4.7 Validación del método

Para la validación de los métodos desarrollados tanto en plasma como en tejido de ratón se evaluaron los siguientes parámetros:

2.4.7.1 Linealidad

Se preparó una curva de calibración en matriz tanto de plasma como en tejido.

Plasma

En un tubo Eppendorff se tomaron 200 μL de plasma y se añadieron 400 μL de acetonitrilo. Esta mezcla se agitó durante 10 segundos en vortex. Se dejó reposar durante 5 minutos y posteriormente y se llevó a centrifugar en la microcentrifuga a

5304 g durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró a través de filtros de Nylon de 0.45 mm. Se tomaron alícuotas del sobrenadante y se fortificaron con diferentes cantidades de la mezcla de antimicrobianos para preparar una curva de calibración en un intervalo de trabajo de 0.15 a 20 $\mu\text{g/mL}$.

Tejido

Se procesó una muestra control con el procedimiento anteriormente descrito. Del filtrado obtenido se tomaron alícuotas que fueron adicionadas con las soluciones estándar (mezcla de antimicrobianos de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$) para preparar la curva de calibración en un intervalo de trabajo de 0.166 a 16.66 $\mu\text{g/mL}$.

Todas las soluciones estándar se prepararon por triplicado para construir las curvas de calibración. Se utilizó el programa Excel para obtener la ecuación de la recta. Para establecer el intervalo lineal se evaluó el coeficiente de regresión y el coeficiente de variación de los factores de respuesta, el cual fue calculado por medio de la ecuación 5. El coeficiente de variación de los factores de respuesta también fue calculado con la ecuación 6.

Para evaluar si existía efecto de matriz, se compararon los datos de recuperación obtenidos a partir de la curva de calibración en plasma y tejido de ratón infectado con micetoma, con los obtenidos con los estándares preparados en buffer. La comparación de los datos se hizo con ayuda del programa Excel.

2.4.7.2 Límite de detección

El límite de detección se consideró como la concentración mas baja del analito que se pudiera diferenciar claramente de la señal del ruido. Este límite se evaluó tanto para plasma como para tejido infectado (Guías de validación de la FDA 2001). Este límite también fue establecido conforme al cálculo que se mostró en la ecuación 7.

2.4.7.3 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se consideró como la concentración más baja de la curva de calibración con al menos 5 veces la señal del blanco y que tuviera una respuesta identificable, y reproducible con una precisión menor del 20% y una exactitud de 80-120%. Este límite se evaluó tanto para plasma como para tejido infectado (Guías de validación de la FDA 2001). Este límite también fue establecido también conforme al cálculo que se mostró en la ecuación 8.

2.4.7.4 Precisión intradía e interdía

Se prepararon 3 muestras de plasma de tres diferentes concentraciones y fueron analizadas. Se evaluaron los datos de área de pico a partir de los cromatogramas obtenidos y se calculó el coeficiente de variación. Para la precisión interdía se evaluaron los datos obtenidos del análisis de soluciones de estas mismas concentraciones pero obtenidos en tres diferentes días.

2.4.7.5 Exactitud

La exactitud del método fue evaluada como recuperación y se realizó de la siguiente manera:

Plasma

Alícuotas de 50 μL de plasma fueron fortificadas con la mezcla estándar para obtener concentraciones finales de 0.3, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Estas muestras fueron sometidas al proceso de preparación de muestras previamente descrito. Los resultados de concentración se obtuvieron con el método de estándar externo, por medio de la ecuación de la recta. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada nivel de concentración para y con los datos obtenidos calcular el coeficiente de variación de acuerdo a la ecuación 6.

Tejido infectado de ratón

Alícuotas de tejido infectado de ratón fueron fortificadas con la mezcla estándar para obtener concentraciones finales de 0.4, 2 y 8 $\mu\text{g/mL}$. Estas muestras fueron sometidas al proceso de preparación de muestras previamente descrito (tratamiento de muestra). Los resultados de concentración se obtuvieron con el método de estándar externo, por medio de la ecuación de la recta. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada nivel de concentración y con los datos obtenidos calcular el coeficiente de variación de acuerdo a la ecuación 6.

2.4.7.6 Selectividad

Se analizaron 7 diferentes muestras de plasma y de tejido infectado libre de antimicrobianos para comprobar que las señales propias de la matriz no presentaran interferencia con las señales de los analitos. La identificación de los compuestos en las muestras se realizó utilizando tanto los tiempos de retención como por la comparación de los espectros DAD de las señales cromatográficas con los de los respectivos estándares.

2.4.7.7 Estabilidad

Un pool de plasma se fortificó con 5 µg/mL y se separó en diferentes alícuotas las cuales fueron congeladas a -20 °C y analizadas semanalmente hasta por 6 meses. La estabilidad se evaluó mediante el seguimiento a través de una carta control teniendo como límites los valores obtenidos del análisis de precisión.

2.4.8 Análisis de amikacina por CLAR-Fluorescencia. Derivación con ortoftaldehído/2 mercaptoetanol (OPA/2 ME).

Entre los reactivos utilizados para formar derivados con la amikacina, fue seleccionado el ortoftaldehído/2-mercaptoetanol.

Reacción de ortoftaldehído.

En presencia de un mercaptano, como el 2 mercaptoetanol (2 ME), el OPA reacciona rápidamente con el grupo amino formando derivados isoindol fluorescentes (figura 13) La reacción es rápida, sencilla, se lleva a cabo en medio acuoso y a temperatura ambiente (Salazar 1993).

Para obtener el derivado fluorescente de la amikacina se realizó el siguiente procedimiento: En un tubo eppendorf se colocaron 60 µL de solución para derivar (solución estándar, plasma desproteinizado fortificado con amikacina), se añadieron 80 µL de agua y 60 µL de la solución derivatizante. Esta mezcla se agitó manualmente durante un minuto. Posteriormente, con ayuda de una pipeta automática, se transfirió esta mezcla en un vial con un inserto y se inyectó en el cromatógrafo.

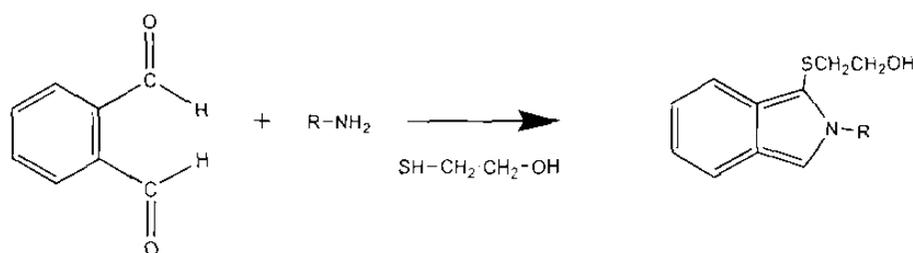


Figura 13. Reacción de OPA/2ME con grupo amino

Se trabajó con el estándar de amikacina, así como con plasma de ratón libre de antimicrobianos.

2.4.9 Aplicabilidad

Los métodos desarrollados fueron aplicados tanto en plasma como en tejido de ratón infectado al cual se le administraron mezclas de los antimicrobianos propuestos para el tratamiento del actinomicetoma.

2.4.9.1 Plasma

Se realizaron determinaciones en plasma de los antimicrobianos linezolid y garenoxacina. Las muestras fueron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. Se descongelaron hasta alcanzar temperatura ambiente. Se tomaron $50\text{ }\mu\text{L}$ de plasma y se sometieron al método de procesamiento anteriormente descrito.

2.4.9.2 Tejido

Se analizaron muestras de tejido de ratón. Los ratones tenían infección con actinomicetoma y se les había administrado un tratamiento con mezclas de antimicrobianos. Las mezclas administradas fueron: sulfametoxazol-trimetoprim-

linezolid, por un lado; y, por otro lado, linezolid con garenoxacina. Las dosis administradas fueron las siguientes: trimetoprim 4 mg/kg; sulfametoxazol 20 mg/kg; linezolid 25 mg/kg y garenoxacina 75 mg/kg. Los antimicrobianos se administraron cada 12 horas durante tres semanas, y al término de este tiempo los ratones fueron sacrificados 12 horas después de la última administración del tratamiento.

Las muestras de tejido obtenidas fueron sometidas al método de procesamiento anteriormente descrito.

3

RESULTADOS**3.1 Sistema cromatográfico**

De los 5 sistemas cromatográficos probados durante el desarrollo del método las mejores condiciones cromatográficas para la separación de amoxicilina (AMX), trimetoprim (TMP), sulfametoxazol (SMX), linezolid (LZ) y garenoxacina (GR) se obtuvieron utilizando una columna Waters Atlantis dC₁₈ (150 x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula), a una temperatura de 30 °C y a un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó con un programa de gradiente utilizando una fase móvil compuesta de: solvente A ácido trifluoroacético al 0.1 % y solvente B acetonitrilo.

3.1.1 Optimización del sistema

En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos al utilizar 3 diferentes programas de elución (Tabla VI de material y métodos). El mayor número de platos teóricos (N) y los valores óptimos de selectividad (α), resolución (R) y factor de capacidad (k') fueron obtenidos con el programa de elución 3 (tabla VI), con duración de 30 minutos. En todos los casos se mantuvo una temperatura de 30°C y un flujo de 1 mL/min.

TABLA VIII
PARÁMETROS DE EFICIENCIA OBTENIDOS DURANTE LA
OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Antimicrobiano	Gradiente 1				Gradiente 2				Gradiente 3			
	N*	k'*	α *	R*	N	k'	α	R	N	K'	α	R
AMX	3640	3.1			4355	3.1			11367	3.9		
TMP	15536	5.9	1.9	25.8	7747	4.5	1.4	11.5	31254	5.9	1.5	25
LZ	9361	7.5	1.3	9.6	9821	6.2	1.4	12.1	17179	7	1.2	9.9
SMX	9083	7.9	1	3.2	7122	6.5	1	2.3	20079	7.5	1.1	4.4
GR	2815	8.6	1	2.5	1960	7.9	1.2	4.2	8675	10	1.4	12

N = Número de platos teóricos, k' = factor de capacidad, α = factor de selectividad, R = resolución. Las condiciones seleccionadas fueron las señaladas en el gradiente 3.

La figura 14 muestra el cromatograma de la separación de antimicrobianos a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$. El volumen de inyección fue de 10 μL y la detección se llevó a cabo por UV a 254 nm para todos los analitos. El orden de elución fue el siguiente: amoxicilina con tiempo de retención de 9.83 min, trimetoprim 13.76 min, linezolid 16.20 min, sulfametoxazol 17.11 min y garenoxacina 23.22 min. Sulfametoxazol, linezolid y garenoxacina también se determinaron por fluorescencia: para la determinación de sulfametoxazol y linezolid se programó el espectrofluorómetro a longitudes de onda de excitación y de emisión de 282 y 392 nm respectivamente y la garenoxacina se determinó empleando longitudes de onda de 292 nm de excitación y 408 nm de emisión.

La figura 15 muestra el cromatograma con detección por fluorescencia.

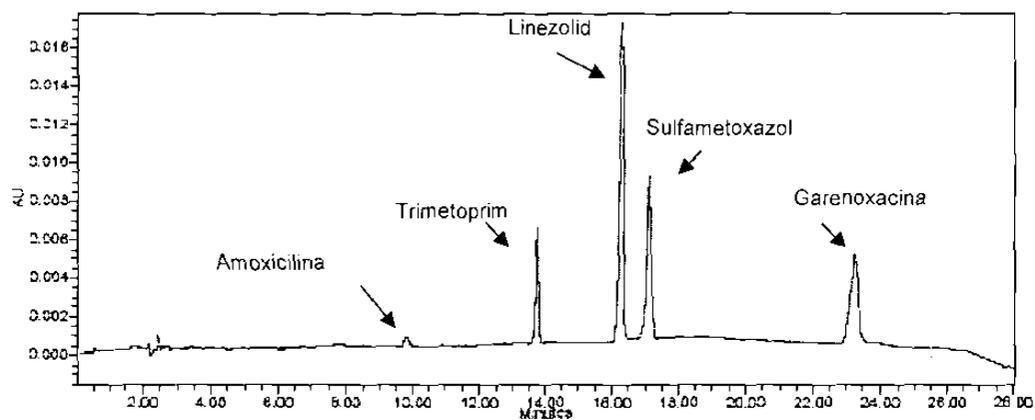


Figura 14. Cromatograma de la mezcla estándar de antimicrobianos a 5 $\mu\text{g/mL}$. 1) amoxicilina 2) trimetoprim 3) linezolid 4) sulfametoxazol 5) garenoxacina. Fase estacionaria: Columna Atlantis C_{18} Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo elución en gradiente. Detección UV 254 nm.

TABLA IX

PROGRAMA DE ELUCIÓN PARA LA SEPARACIÓN DE ANTIMICROBIANOS

Tiempo minutos	TFA 0.1%	Acetonitrilo
1	92	8
4	92	8
14	73	27
24	73	27
26	92	8
30	92	8

Condiciones de análisis: Fase estacionaria Columna Atlantis dC_{18} . Fase móvil ATF 0.1% con Acetonitrilo. Flujo 1 mL/min. Temperatura 30°C

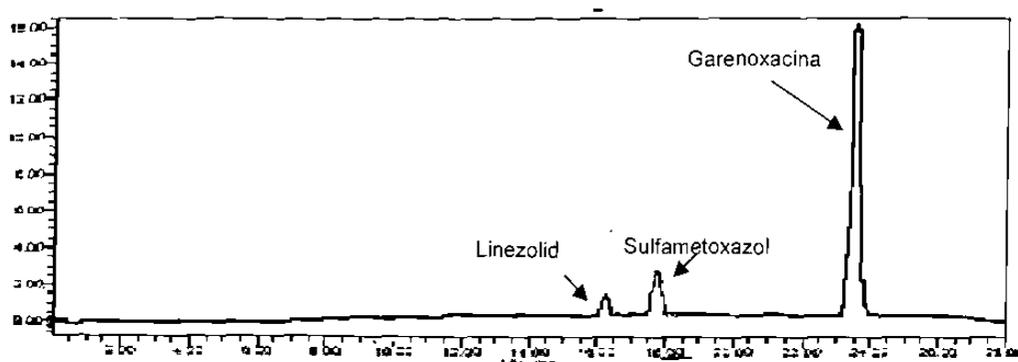


Figura 15. Cromatograma de la mezcla estándar de antimicrobianos a 5 $\mu\text{g/mL}$. 1) linezolid 2) sulfametoxazol 3) garenoxacina. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC_{18} Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo Elución en gradiente. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina.

En la figura 16 se muestran los espectros de absorción de cada uno de los componentes obtenidos con el detector de arreglo de diodos (DAD).

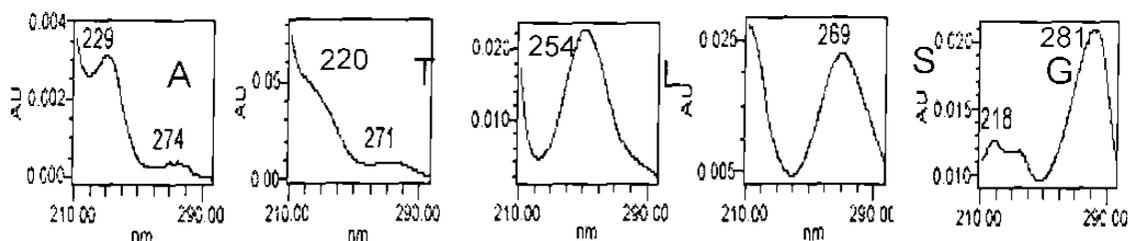


Figura 16. Espectros de absorción de A:amoxicilina, T:trimetoprim, L:linezolid S:sulfametoxazol G:garenoxacina. Los máximos de absorción son: amoxicilina 229 nm, trimetoprim 220 nm, linezolid 254 nm, sulfametoxazol 269 nm y garenoxacina 281 nm. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna Atlantis dC_{18} Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo Elución en gradiente. Detector de arreglo de diodos.

3.1.2 Validación del sistema: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección UV a 254 nm

3.1.2.1 Intervalo lineal

El intervalo lineal para amoxicilina fue de 1.2-20 $\mu\text{g/mL}$. Para Trimetoprim de 0.15 a 20 $\mu\text{g/mL}$, sulfametoxazol y linezolid fue de 0.15-40 $\mu\text{g/mL}$ y para garenoxacina fue de 0.3 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

La tabla X muestra los datos de validación obtenidos para el intervalo lineal de trabajo: Factor de respuesta promedio para cada analito, coeficiente de variación de los factores de respuesta (RSD), la ecuación de regresión con los valores de la pendiente (m), y el intercepto (b), así como el coeficiente de correlación (R^2). La figura 15 muestra las curvas de calibración promedio de los datos de calibración que se obtuvieron de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito (procedimiento 2.4.7.1).

TABLA X

INTERVALO LINEAL Y ECUACIONES DE REGRESIÓN OBTENIDAS PARA ANTIMICROBIANOS. DETECCIÓN UV 254 nm

Analito	Rango lineal	FR	RSD _{FR} *	Ecuación de regresión $Y = mx + b$	R^2
Amoxicilina	1.2 – 20	758	11.7	$y = 878x - 534.4$	0.997
Trimetoprim	0.15 – 20	9545	12.6	$y = 9533x + 1262$	0.998
Linezolid	0.15 – 40	25108	10.7	$y = 28778x - 9612.7$	0.997
Sulfametoxazol	0.15 – 40	17013	8.7	$y = 17629x + 603$	0.999
Garenoxacina	0.30 – 10	15684	9.3	$y = 17291x - 1818.2$	0.999

*Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Los datos son el promedio de tres determinaciones. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm

3.1.2.2 Límites de detección y límites de cuantificación

En la tabla XI se muestran los límites de detección y de cuantificación obtenidos para cada antimicrobiano. Los límites fueron establecidos de acuerdo a las guías de validación de la FDA, y por cálculo tomando en cuenta la señal del blanco (European Agency, Miller 2003).

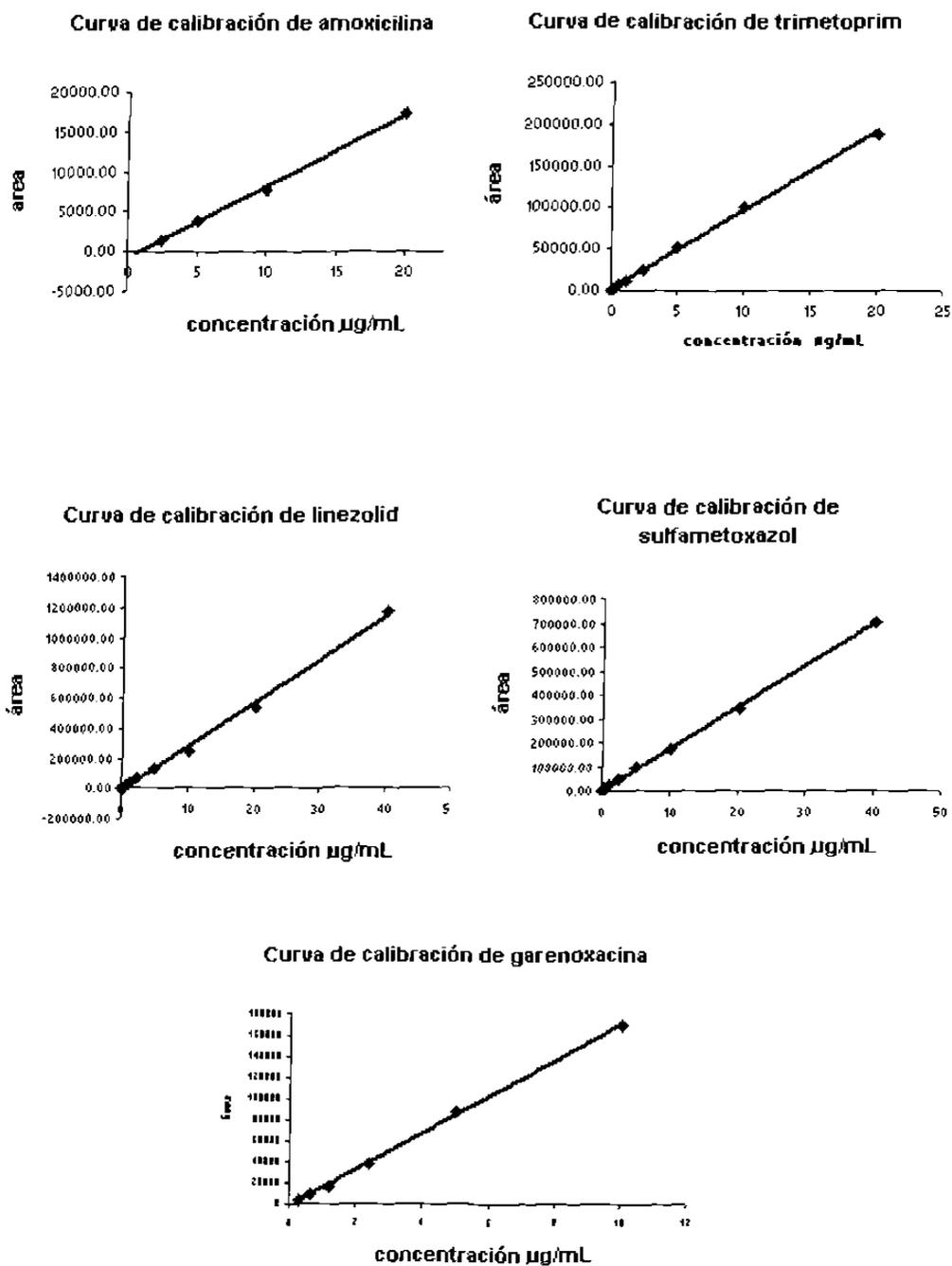


Figura 17. Curvas de calibración obtenidas para los antimicrobianos. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC18. Fase móvil ATF 0.1%: Acetonitrilo. Flujo 1mL/min. Elución en gradiente. Detección UV 254 nm.

TABLA XI
LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
ANTIMICROBIANOS. DETECCIÓN UV

Antimicrobiano	LD (FDA) µg/mL	LC (FDA) µg/mL	LD (calculado) µg/mL	LC (calculado) µg/mL
Amoxicilina	0.60	1.20	0.3	0.9
Trimetoprim	0.07	0.15	0.03	0.08
Linezolid	0.06	0.15	0.007	0.02
Sulfametoxazol	0.06	0.15	0.008	0.02
Garenoxacina	0.15	0.30	0.012	0.04

Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm

3.1.2.3 Precisión intradía e interdía

En la tabla XII se muestran los coeficientes de variación del sistema obtenidos para los antimicrobianos a tres niveles de concentración: para amoxicilina los niveles fueron de 2.4, 5 y 10 µg/mL; para el resto de los antimicrobianos los niveles fueron 0.3, 5 y 10 µg/mL. Los datos fueron calculados a partir de los datos de área de pico cromatográfico. Todos los valores se encuentran dentro del límite del 15% (FDA Bioanalytical validation 2001).

En la tabla XIII se muestran los coeficientes de variación del sistema, de análisis realizados en tres días diferentes, obtenidos para los antimicrobianos a tres niveles de concentración: para amoxicilina los niveles fueron de 2.4, 5 y 10 µg/mL; para el resto de los antimicrobianos los niveles fueron 0.3, 5 y 10 µg/mL. Los datos

TABLA XII

PRECISIÓN INTRADÍA DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Analito	RSD	RSD	RSD
	0.3µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL
Amoxicilina*	8.0	3.7	2.7
Trimetoprim	8.1	3.0	6.5
Linezolid	4.5	2.1	0.6
Sulfametoxazol	1.9	2.6	1.4
Garenoxacina	13.3	2.6	1.5

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm *El nivel bajo para amoxicilina es 2.4 µg/mL.

fueron calculados a partir de los datos de área de pico cromatográfico. Todos los valores se encuentran dentro del límite del 15% (FDA Bioanalytical validation, 2001).

3.1.2.4 Robustez

El análisis de datos obtenidos a partir del diseño experimental se muestra en la tabla XIV. En la parte superior se muestra el valor de la desviación estándar obtenido del análisis de precisión para cada antimicrobiano. Se obtuvieron los tiempos de retención de cada antimicrobiano a partir del cromatograma obtenido para cada una de las modificaciones propuestas de acuerdo al diseño experimental. Los valores de las medias de las diferencias se muestran en cada recuadro. Cada uno de estos valores fue comparado con la desviación estándar y, al ser mayores que ésta, puede afirmarse que la modificación de todos los parámetros afecta significativamente al método. Excepto en el caso de la garenoxacina, en el

cambio de proporción inicial de acetonitrilo, todas las medias resultaron mayores que las desviaciones estándar, por lo que el cambio en cualquiera de las condiciones probadas afecta significativamente al método.

TABLA XIII
PRECISIÓN INTERDÍA DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Analito	RSD	RSD	RSD
	0.3µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL
Amoxicilina*	5.0	7.0	11.0
Trimetoprim	5.7	11.1	13.8
Linezolid	12.9	2.7	5.2
Sulfametoxazol	12.3	6.4	7.7
Garenoxacina	7.6	9.5	10.3

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisC18, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1 mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm *El nivel bajo para amoxicilina es 2.4 µg/mL.

3.1.2.5 Estabilidad

La amoxicilina resultó muy inestable, no así para el resto de los antimicrobianos los cuales mostraron estabilidad hasta por dos semanas. Estas gráficas se muestran en la figura 18.

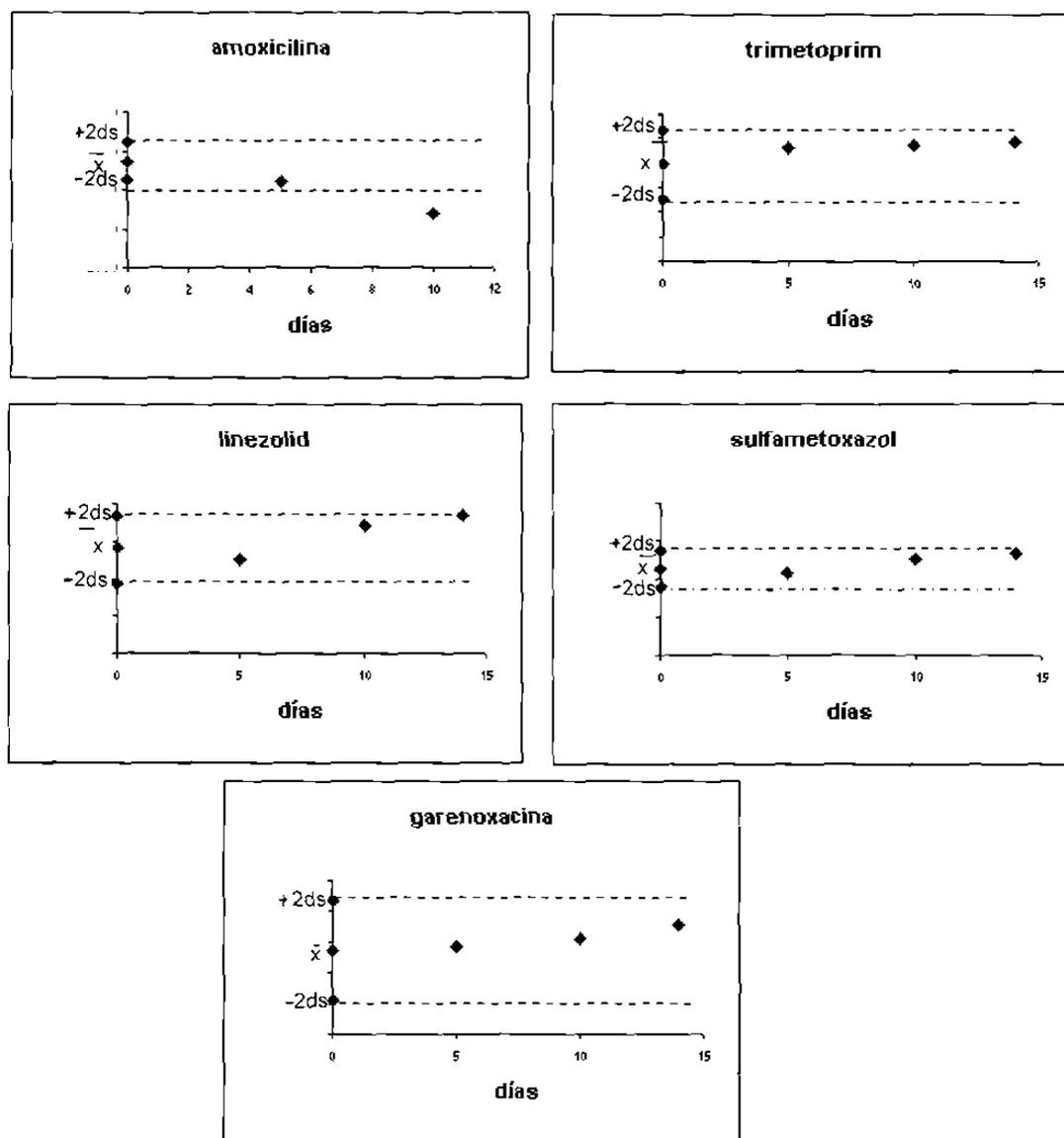


Figura 18. Gráficas de estabilidad de antimicrobianos en la mezcla estándar. La mezcla fue preparada en buffer de fosfatos 0.01M pH 7.2 M

3.1.3 Validación del sistema: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección por fluorescencia

3.1.3.1 Intervalo lineal

La tabla XV muestra los datos de validación obtenidos para el intervalo lineal de trabajo: Factor de respuesta promedio para cada analito, coeficiente de variación de los factores de respuesta (RSD), la ecuación de regresión con los valores de la

pendiente (m), y el intercepto (b), así como el coeficiente de correlación (R^2). La figura 19 muestra las curvas de calibración obtenidas para cada antimicrobiano.

TABLA XIV
RESULTADOS DEL ENSAYO DE ROBUSTEZ

Antimicrobiano Variable	AMX $ds_{tR} =$ 0.0121	TMP $ds_{tR} =$ 0.01	LZ $ds_{tR} =$ 0.013	SMX $ds_{tR} =$ 0.015	GR $ds_{tR} =$ 0.009
Temperatura °C 28/32	0.64	0.14	0.126	0.21	0.44
Flujo mL/min 0.8/1.2	0.50	1.79	2.58	3.27	4.67
ATF% 0.05/0.15	0.35	1.37	1.83	0.07	2.42
Acetonitrilo 6/10	1.06	0.78	0.56	0.55	0.005
Vol. de inyección (µL) 5/15	1.77	0.03	0.06	0.60	0.51
Solvente de la mezcla ATF/Acetonitrilo	0.82	0.01	0.05	0.12	2.61
$\lambda_{em}/\lambda_{ex}$ (nm)	--	--	0.43	0.43	0.152

TABLA XV

**INTERVALO LINEAL Y ECUACIÓN DE REGRESIÓN OBTENIDAS PARA
GARENOXACINA, LINEZOLID Y SULFAMETOXAZOL
DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA**

Analito	Intervalo lineal	FR	RSD_{FR}^*	Ecuación de regresión $y = mx + b$	R^2
Garenoxacina	0.15 – 20	49127	13	$y = 58475x - 23340$	0.996
Linezolid	2.4 – 20	845	16	$y = 1091x - 2187$	0.997
Sulfametoxazol	2.4 – 20	3685	10	$y = 4250x - 4204$	0.996

*Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Los datos son el promedio de tres determinaciones. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina.

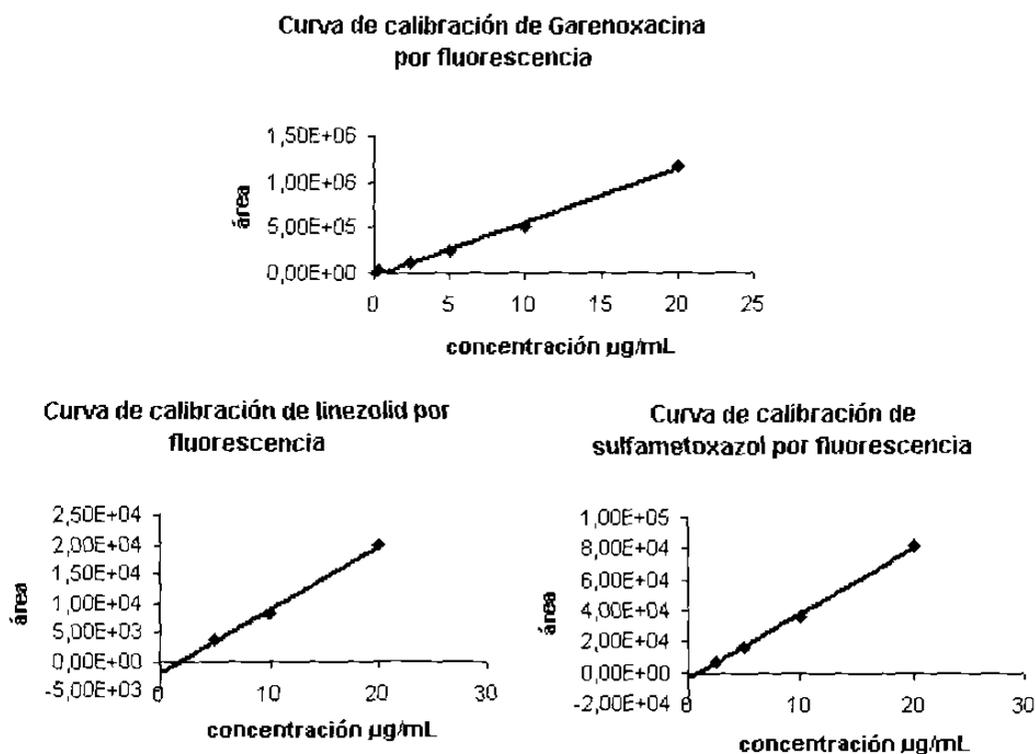


Figura 19. Curvas de calibración para garenoxacina, linezolid y sulfametoxazol. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC18 Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo elución en gradiente. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina.

3.1.3.2 Límites de detección y límites de cuantificación por CLAR-fluorescencia

En la tabla XVI se muestran los límites de detección y de cuantificación obtenidos para cada antimicrobiano.

3.1.3.3 Precisión por CLAR-Fluorescencia

En la tabla XVII se muestran los coeficientes de variación intradía del sistema obtenidos para linezolid, sulfametoxazol y garenoxacina a niveles de concentración de 2.4, 5 y 10 µg/mL para sulfametoxazol y 5, 10 y 20 para linezolid y 0.3, 2.4 y 10 para garenoxacina.

TABLA XVI
LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
ANTIMICROBIANOS
CLAR-FLUORESCENCIA

Antimicrobiano	LD (FDA) µg/mL	LC (FDA) µg/mL
Linezolid	1.2	5.0
Sulfametoxazol	0.6	2.4
Garenoxacina	0.065	0.15

Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina.

En la tabla XVIII se muestran los coeficientes de variación del sistema obtenidos para linezolid, sulfametoxazol y garenoxacina a niveles de concentración de 2.4, 5 y 10 µg/mL.

TABLA XVII
PRECISIÓN INTRADÍA DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Analito	RSD	RSD	RSD
Linezolid	7.0	2.7	5.2
Sulfametoxazol	6.1	6.4	7.7
Garenoxacina	5.2	2.0	0.1

Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina.

3.1.3.4 Robustez

Los resultados de robustez se muestran en la XVI en donde fueron evaluados cambios en las longitudes de onda de excitación y de emisión. La variación en estos parámetros produce un cambio significativo sobre el desempeño del método.

TABLA XVII

PRECISIÓN INTERDÍA DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Analito	RSD	RSD	RSD
Linezolid	15.0	12.0	12.0
Sulfametoxazol	12.0	3.0	2.0
Garenoxacina	15.0	9.5	10.3

Las determinaciones se realizaron por quintuplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisC18, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina

3.1.4 Análisis de Amikacina por CLAR-Fluorescencia. Derivación con OPA

El cromatograma obtenido del análisis de la amikacina, a una concentración de 100 µg/mL se observa en la figura 20. Puede apreciarse que el derivado fluorescente de este analito presentó una muy baja respuesta al detector.

En la figura 20 también se muestra el cromatograma de plasma libre de antimicrobianos con el reactivo de derivatización OPA/2ME. Puede apreciarse varias señales alrededor del tiempo de retención de la amikacina (19.3 minutos).

ANÁLISIS DE AMIKACINA CON OPA/ 2ME

a) solución estándar b) en plasma

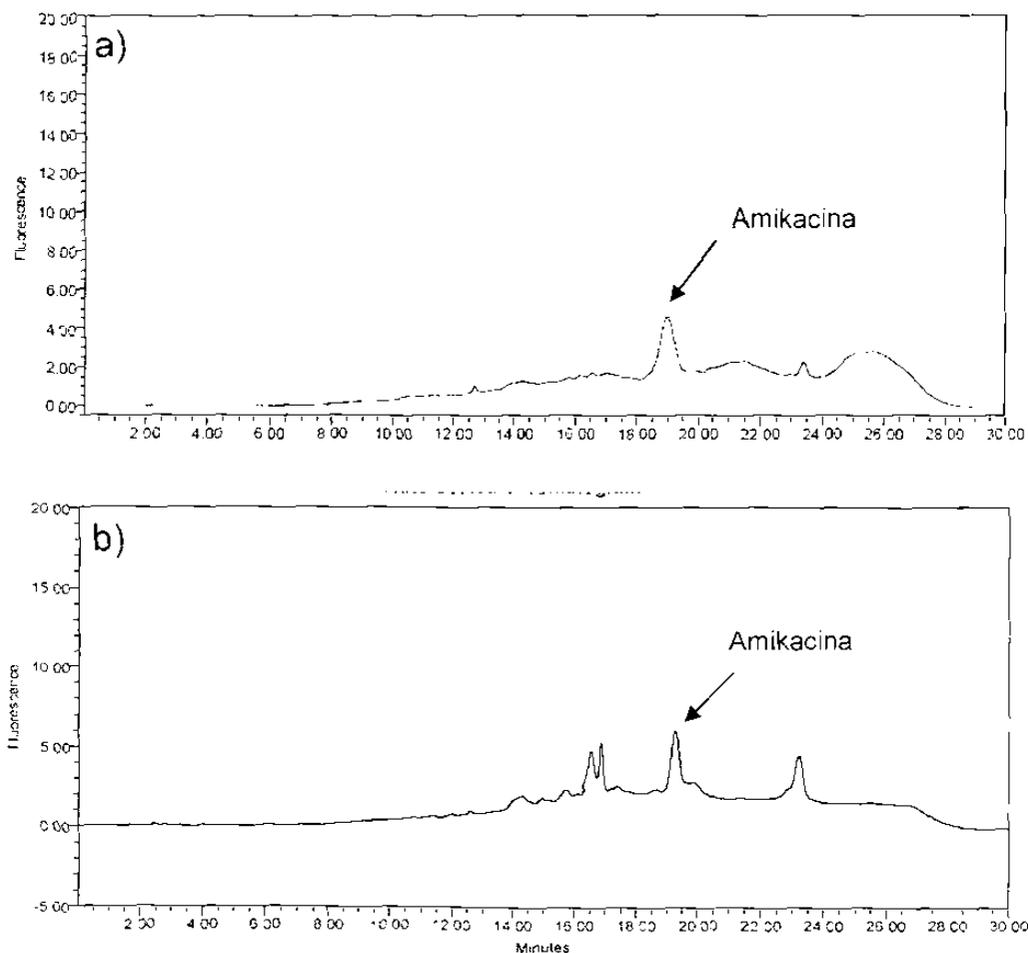


Figura 20 a) Cromatograma de amikacina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derivatizada con OPA/ 2ME b) Cromatograma de amikacina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en plasma derivatizada con OPA/ 2ME .Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisC18, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 365/465 nm. La flecha indica la señal de la amikacina

3.2 Métodos analíticos desarrollados en plasma y tejido

3.2.1 Tratamiento de la muestra

3.2.1.1 Elección del solvente para precipitar proteínas

Se probaron tres diferentes solventes para realizar la precipitación de proteínas. En la tabla XVIII se comparan los resultados obtenidos tanto de recuperación como de precisión. De los tres solventes que se probaron se seleccionó el acetonitrilo para realizar el procedimiento de precipitación de proteínas adicionando 200 μL de acetonitrilo a una alícuota de 50 μL de plasma. Los porcentajes de recuperación más altos se obtuvieron con metanol, los mas bajos con ácido trifluoroacético. Todos los valores de coeficientes de variación son menores del 15%.

TABLA XVIII

RESULTADOS DE RECUPERACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES PRECIPITANTES

Antimicrobiano \ Solvente	% de recuperación			RSD		
	1*	2*	3*	1	2	3
Amoxicilina	61	194	51	11	8	11
Trimetoprim	98	105	89	2.1	6.1	4.4
Linezolid	100	108	95	1.5	6.2	2.6
Sulfametoxazol	104	107	95	3.9	4.5	3.4
Garenoxacina	143	156	109	3.4	5.5	6.7

1* Acetonitrilo 2* Metanol 3* Ácido trifluoroacético. En todos los casos se añadieron 200 μL del agente precipitante a 50 μL de plasma

Los datos obtenidos a partir del análisis de varianza se muestran en la tabla XIX. Los datos de recuperación mostrados anteriormente se compararon con el valor F de tablas, obtenido con un valor de confianza de 95%. Como F calculado es mayor que el valor F de tablas se demostró que hay diferencia significativa entre los solventes que se utilizaron para precipitar proteínas. El solvente seleccionado fue acetonitrilo.

3.2.1.2 Volumen de muestra

A partir de los valores de recuperación obtenidos en función de dos diferentes volúmenes de plasma utilizados para el procedimiento de precipitación de proteínas (50 y 100 μL) se calculó la varianza y se aplicó la prueba F de significancia. En la tabla XX se comparan los valores F calculados con el valor F de tablas obtenido tomando en cuenta un nivel de confianza de 95%. Los valores de F calculados son menores que los valores F de tabla (9.28) tomando en cuenta un nivel de confianza del 95% , por lo tanto no existe diferencia significativa entre los procedimientos realizados. Se seleccionó el volumen de 50 μL para el desarrollo del método.

TABLA XIX
ANÁLISIS DE VARIANZA

Solvente / Antimicrobiano	F _{calculado}	F _{tablas}
Trimetoprim	7.30	5.14
Linezolid	6.79	
Sulfametoxazol	6.26	
Garenoxacina	33.47	

Para encontrar diferencia en la recuperación de antimicrobianos utilizando diferentes agentes precipitantes. Valor F de tablas con un nivel de confianza del 95%

TABLA XX
PRUEBA F

Volumen	Valor $F_{\text{calculado}}$	F_{tablas}
Amoxicilina	6.28	9.28
Trimetoprim	3.53	
Linezolid	2.35	
Sulfametoxazol	2.80	
Garenoxacina	4.61	

Aplicada para encontrar diferencia entre el volumen de plasma utilizado para precipitar proteínas Valor F de tablas con un nivel de confianza del 95%.

3.2.2 Validación del método cromatográfico para la determinación de antimicrobianos en plasma: CLAR con detección UV 254 nm

En la figura 21 se muestra un cromatograma de plasma de ratón adicionado con la mezcla de antimicrobianos a concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

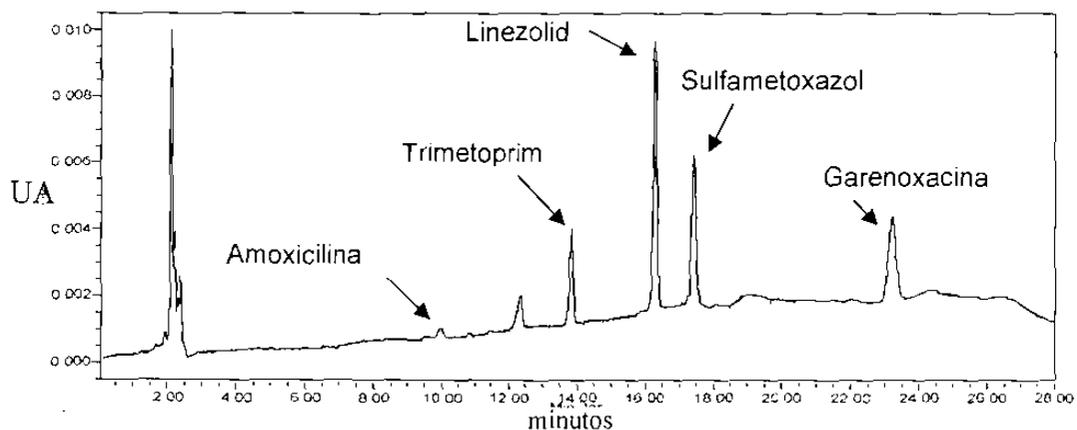


Figura 21. Cromatograma de la mezcla de estándares a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en plasma de ratón. Columna Atlantis dC_{18} 5 μm (150 x 4.6 mm), Fase móvil TFA 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30 °C. Detección 254 nm.

Para el análisis se utilizó el sistema cromatográfico propuesto anteriormente. Los tiempos de retención, en minutos, fueron: amoxicilina 10.81, trimetoprim 13.48, linezolid 16.31, sulfametoxazol 17.43 y garenoxacina 23.22. La detección se realizó a 254 nm. El flujo fue de 1 mL/min y la temperatura de la columna se mantuvo a 30°C. Las señales con tiempo de retención menor de 2 minutos, así como la señal que aparece aproximadamente a los 12 minutos, provienen de constituyentes del plasma.

3.2.2.1 Linealidad, límites de detección y de cuantificación

El intervalo lineal de trabajo para amoxicilina fue de 2.4 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Para trimetoprim, sulfametoxazol y linezolid fue de 0.3 a 20 $\mu\text{g/mL}$ y para garenoxacina fue de 0.3 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

En la tabla XXI se presenta el intervalo lineal, los factores de respuesta y los coeficientes de variación de los factores de respuesta, la ecuación de regresión y el coeficiente de correlación para cada antimicrobiano analizado en la mezcla.

En la tabla XXII se muestran los límites de detección y de cuantificación determinados para cada antimicrobiano.

La figura 22 corresponde a las curvas de calibración preparadas en matriz para cada antimicrobiano.

TABLA XXI

**INTERVALO LINEAL Y ECUACIONES DE REGRESIÓN OBTENIDAS
PARA ANTIMICROBIANOS EN PLASMA**

Analito	Intervalo lineal	FR	RSD _{FR} *	Ecuación de regresión $y = mx + b$	R ²
Amoxicilina	2.4 - 20	770	13	$y = 865.6x - 364.9$	0.998
Trimetoprim	0.3 - 20	8391	7.6	$y = 8819.9x - 775.7$	0.998
Linezolid	0.3 - 20	25101	7.43	$y = 25940x - 3045.8$	0.999
Sulfametoxazol	0.3 - 20	17580	7.55	$y = 17107x + 2119$	0.999
Garenoxacina	0.3 - 10	15969	3.76	$y = 16268x + 132$	0.999

*Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Los datos son el promedio de tres determinaciones. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm

**TABLA XXII
LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
ANTIMICROBIANOS.
DETERMINACIÓN EN PLASMA**

Antimicrobiano	Límite de detección (FDA) µg/mL	Límite de cuantificación (FDA) µg/mL	Límite de detección calculado µg/mL	Límite de cuantificación calculado µg/mL
Amoxicilina	1.2	2.4	0.50	1.40
Trimetoprim	0.15	0.3	0.03	0.10
Linezolid	0.15	0.3	0.06	0.21
Sulfametoxazol	0.15	0.3	0.01	0.03
Garenoxacina	0.15	0.3	0.07	0.22

Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm

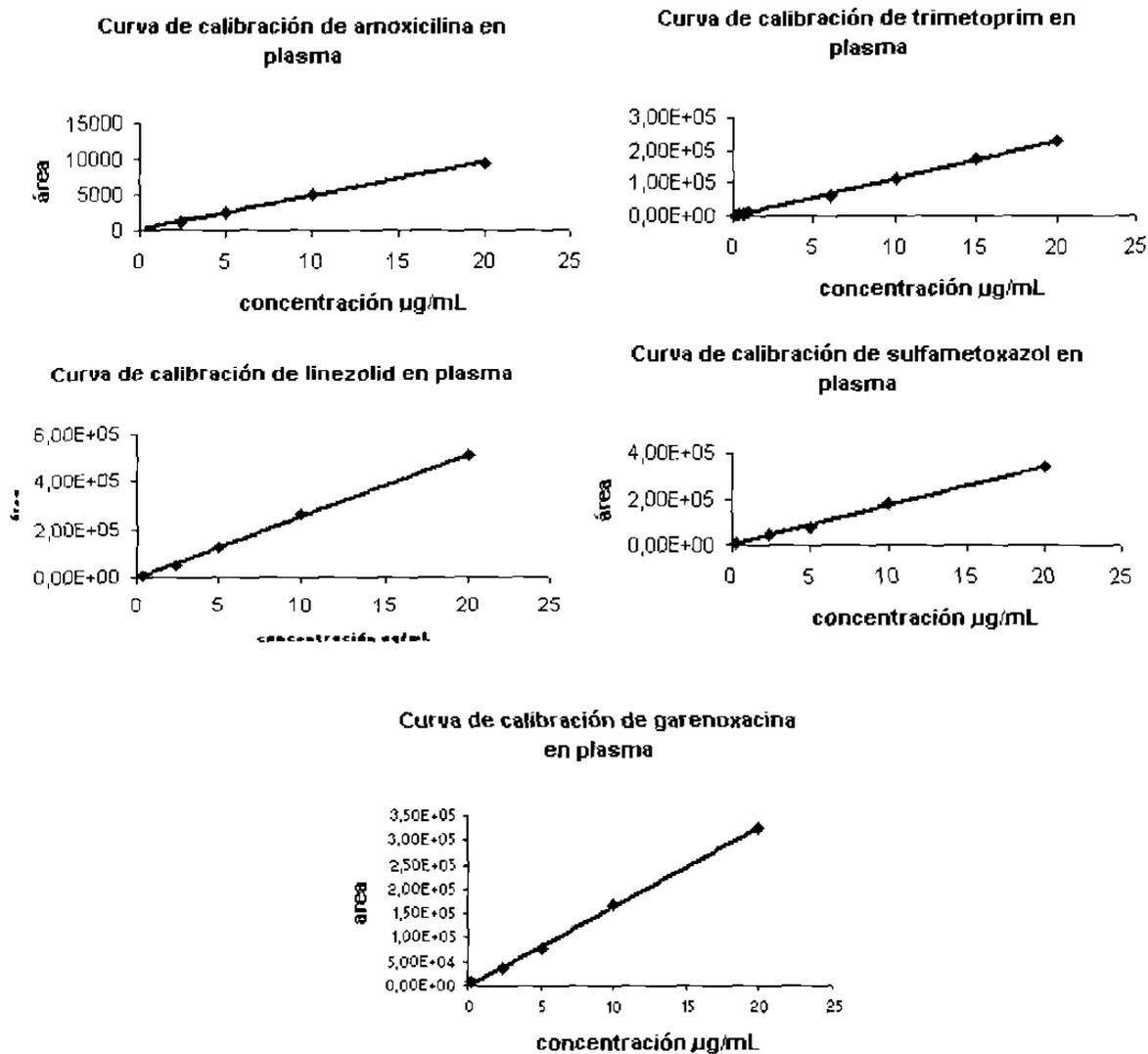


Figura 22. Curvas de calibración obtenidas para los antimicrobianos. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC18. Fase móvil ATF 0.1%: Acetonitrilo. Flujo 1mL/min. Elución en gradiente. Detección UV 254

3.2.2.2 Precisión intradía e interdía

En la tabla XXIII y XXIV se muestran los coeficientes de variación del método cromatográfico a tres niveles de concentración considerados como bajo (0.6 µg/mL), medio (2.4 µg/mL) y alto (10 µg/mL).

TABLA XXIII

**DETERMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLASMA
PRECISIÓN INTRADÍA A TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN**

Antimicrobiano	Precisión intradía		
	RSD		
	0.6 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL
Amoxicilina*	10	3.1	6.5
Trimetoprim	7.0	4.4	2.0
Linezolid	6.0	4.2	3.1
Sulfametoxazol	9.0	6.2	3.5
Garenoxacina	2.0	9.0	3.0

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por UV 254 nm * Valor determinado a concentración de 2.4 µg/mL

TABLA XXIV

**DETERMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLASMA
PRECISIÓN INTERDÍA A TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN**

Antimicrobiano	Precisión intradía		
	RSD		
	0.6 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL
Amoxicilina	12	8.0	12.0
Trimetoprim	9.2	9.0	6.0
Linezolid	8.1	12.0	6.0
Sulfametoxazol	8.0	6.0	7.0
Garenoxacina	8.0	6.0	5.0

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por UV 254 nm. * Valor determinado a concentración de 2.4 µg/mL

3.2.2.3 Exactitud

En la tabla XXV se muestran los resultados de recuperación obtenidos al aplicar el método de desproteinización antes descrito, añadiendo 200 μL acetonitrilo a alícuotas de 50 μL de plasma. Los porcentajes de recuperación fueron calculados utilizando el método de estándar externo a partir de las curvas de calibración elaboradas en matriz plasma. Todos los valores obtenidos se encuentran en el intervalo de 80-120% y con un RSD menor del 15%.

TABLA XXV
DETERMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLASMA
RECUPERACIÓN A TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN

Antimicrobiano	0.6 $\mu\text{g/mL}$	RSD	5 $\mu\text{g/mL}$	RSD	10	RSD
	%R \pm ds		%R \pm ds		$\mu\text{g/mL}$	
Amoxicilina	ND	Nd	88 \pm 5	6	71 \pm 0.8	1
Trimetoprim	118 \pm 11	9	108 \pm 16	15	114 \pm 9	8
Linezolid	104 \pm 4	4	89 \pm 12	14	96 \pm 5	5
Sulfametoxazol	94 \pm 10	11	108 \pm 7	6	110 \pm 12	11
Garenoxacina	111 \pm 13	12	109 \pm 11	10	107 \pm 8	7

Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna Atlantis C_{18} , Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por UV 254 nm.

3.2.2.4 Selectividad

Las muestras analizadas de plasma no presentaron señales que tuvieran los mismos tiempos de retención de los antimicrobianos. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por el tiempo de retención y por el espectro de absorción de cada uno de los compuestos analizados (figura 16).

3.2.2.5 Estabilidad

Las muestras de plasma con antimicrobianos que fueron almacenadas en congelación fueron estables hasta por un período de seis meses. (Figura 23 a). Las muestras de plasma desproteinizadas y analizadas 10 horas después de su preparación resultaron inestables ya que las señales de los analitos se veían

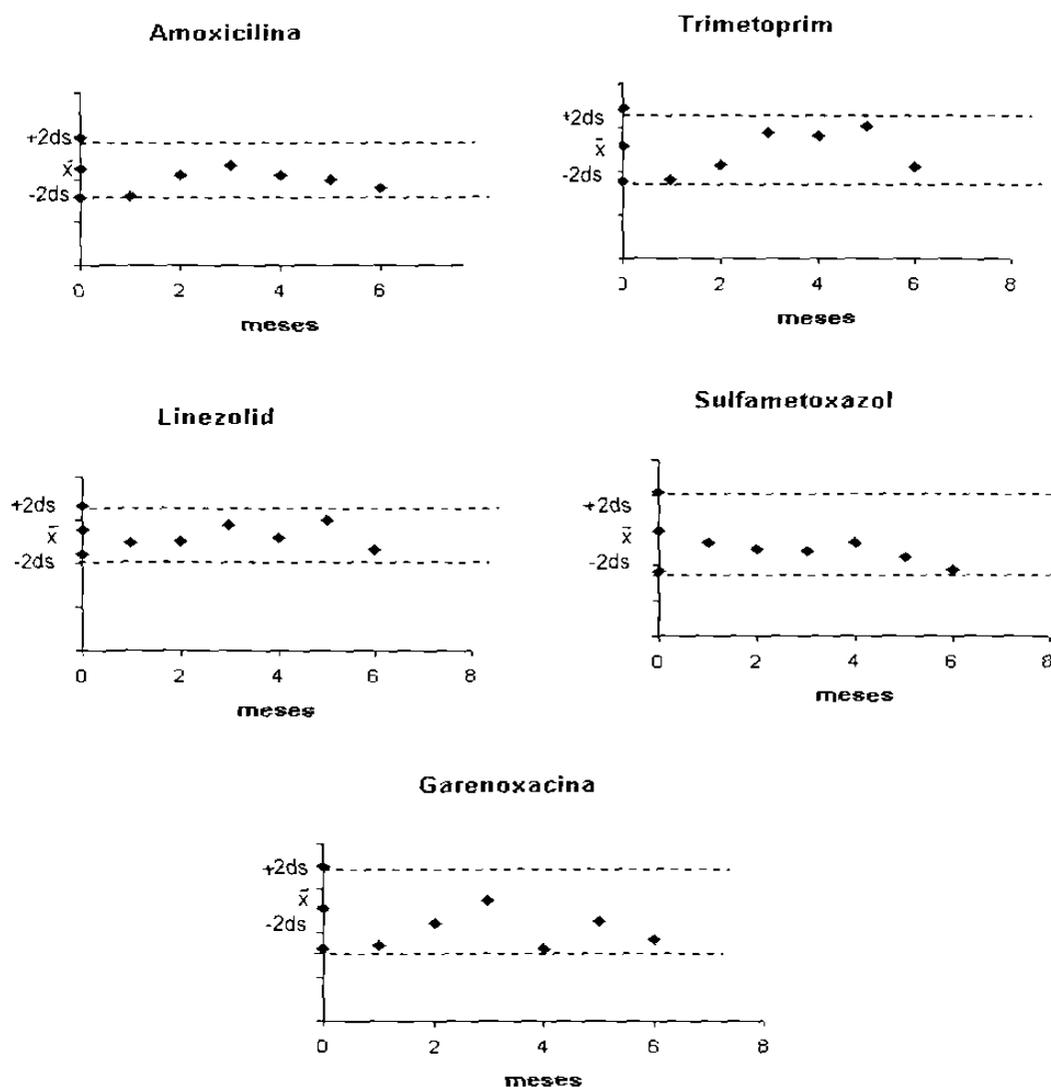


Figura 23 a). Gráficas control para establecer estabilidad de los antimicrobianos. Las muestras de plasma fueron almacenadas a -20°C .

notablemente disminuídas. De la misma manera, las muestras analizadas y guardadas en refrigeración por 24 horas también presentaron una disminución de la señal.

(Figura 23 b)

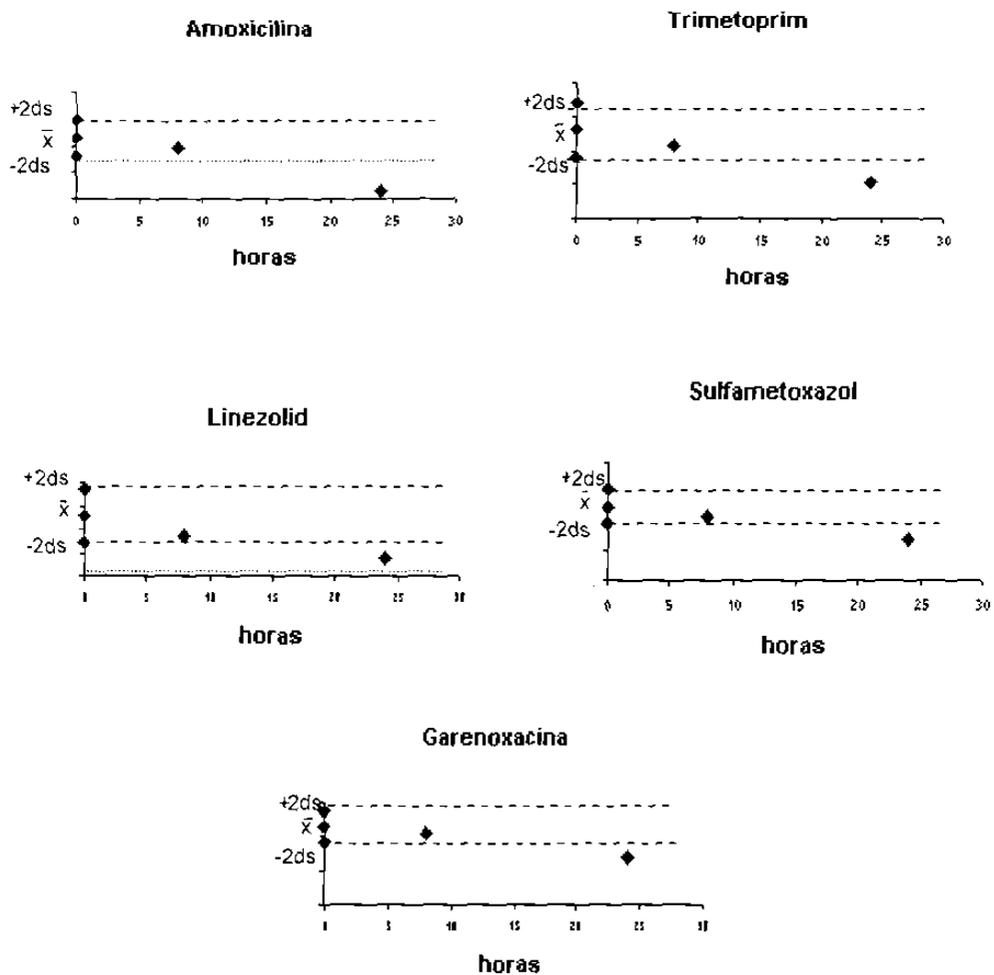


Figura 23 b). Gráficas control para establecer la estabilidad de los antimicrobianos en muestras de plasma preparadas.

3.2.3 Validación del método cromatográfico para la determinación de antimicrobianos en plasma: CLAR con detección por fluorescencia

Se presentan los resultados obtenidos para garenoxacina. Los parámetros de validación para sulfametoxazol y linezolid no fueron obtenidos.

3.2.3.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación

En la tabla XXVI se muestran los datos de: intervalo lineal, factor de respuesta, coeficiente de variación de los factores de respuesta, ecuación de la recta y coeficiente de correlación obtenidos para garenoxacina.

En la tabla XXXI se muestran los límites de detección y cuantificación de acuerdo a la guía de validación, y los valores calculados de acuerdo a las ecuaciones 7 y 8.

TABLA XXVI

INTERVALO LINEAL Y ECUACIÓN DE REGRESIÓN OBTENIDA PARA GARENOXACINA EN PLASMA

Analito	Intervalo lineal	FR	RSD _{FR} *	Ecuación de regresión $y = mx + b$	R ²
Garenoxacina	0.15-20	55263	11	$y = 54207x - 2299$	0.999

Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitudes de onda de excitación/emisión de 292/408.

3.2.3.2 Precisión

El coeficiente e variación obtenido para la concentración de 0.6 ug/mL fue de 4% y para el nivel alto de concentración (10 ug/mL) el coeficiente de variación fue de un 12%

3.2.3.3 Exactitud

Los porcentajes de recuperación obtenidos para garenoxacina fueron desde 99% para el nivel inferior de concentración (0.6 µg/mL) hasta 117 y 118% para las concentraciones de 2.4 y 10 µg/mL.

TABLA XXVII

**LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN
DE GARENOXACINA CLAR-Fluorescencia**

Antimicrobiano	LD (FDA) µg/mL	LC (FDA) µg/mL
Garenoxacina	0.03	0.06

Fase estacionaria: Columna AtlantisC18, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 292/408 nm. Los límites fueron calculados experimentalmente de acuerdo a las guías de la FDA.

3.2.4 Validación del método cromatográfico para la determinación de antimicrobianos en tejido de ratón infectado con actinomicetoma: CLAR con detección UV 254 nm

En la figura 24 se muestra un cromatograma de la determinación de antimicrobianos en tejido de ratón infectado con actinomicetoma. Todos los antimicrobianos están en una concentración de 0.6 µg/mL

Para el análisis se utilizó el sistema cromatográfico propuesto anteriormente. Los tiempos de retención, en minutos, fueron: amoxicilina 10.81, trimetoprim 13.68, linezolid 16.13, sulfametoxazol 16.62 y garenoxacina 23.31. La detección se realizó

a 254 nm. El flujo fue de 1 mL/min y la temperatura de la columna se mantuvo a 30°C. Las señales con tiempo de retención menor de 2 minutos, así como la señal que aparece aproximadamente a los 12 minutos, corresponden a señales de la matriz.

3.2.4.1 Linealidad, límites de detección y de cuantificación

La linealidad para amoxicilina fue de 1.6 a 20 µg/mL. Para trimetoprim, sulfametoxazol y linezolid fue de 0.375 a 20 µg/mL y para garenoxacina fue de 0.375 a 10 µg/mL.

La figura 25 muestra las curvas de calibración obtenidas para los diferentes antimicrobianos.

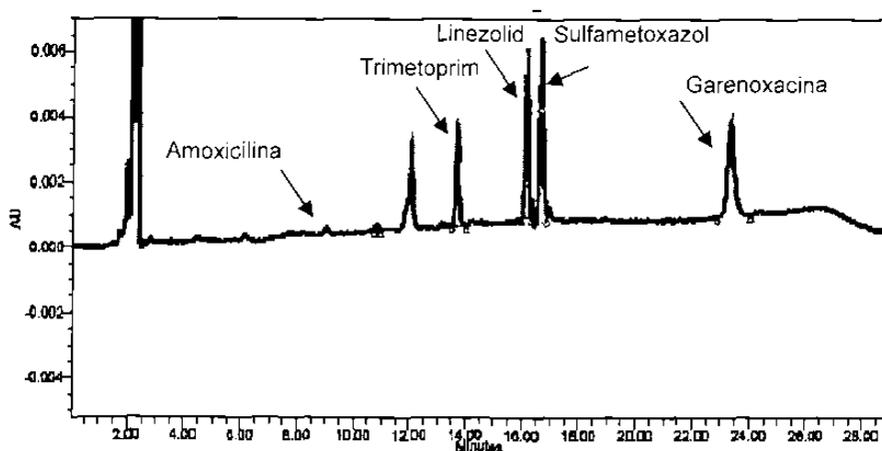


Figura 24. Cromatograma de la mezcla de estándares a 5 µg/mL en tejido de ratón. Columna Atlantis dC18 5µm (150 x 4.6 mm), Fase móvil TFA 0.1%Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30 °C. Detección 254 nm. Las señales cromatográficas corresponden a 1)Amoxicilina, 2) Trimetoprim 3) Linezolid, 4) Sulfametoxazol y 5) Garenoxacina.

En la tabla XXVIII se presenta el intervalo lineal, los factores de respuesta y sus correspondientes coeficientes de variación, la ecuación de regresión y el coeficiente de correlación (R^2) obtenidos para cada antimicrobiano.

En la tabla XXIX se muestran los límites de detección y de cuantificación determinados para cada antimicrobiano.

TABLA XXVIII

INTERVALO LINEAL Y ECUACIONES DE REGRESIÓN OBTENIDAS PARA ANTIMICROBIANOS EN TEJIDO INFECTADO

Analito	Intervalo lineal	FR	RSD _{FR} *	Ecuación de regresión $y = mx + b$	R ²
Amoxicilina	1.66- 20	1118	13.1	$y = 1241.5x - 613$	0.992
Trimetoprim	0.375 - 20	11494	13.7	$y = 11394x - 598.6$	0.996
Linezolid	0.375 - 20	25940	12.3	$y = 25940x - 3045.8$	0.997
Sulfametoxazol	0.375 - 20	21325	11.7	$y = 21576x - 1970$	0.997
Garenoxacina	0.375 - 10	15446	12.2	$y = 19092x - 3900$	0.997

*Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Los datos son el promedio de tres determinaciones. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈. Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30 °C. Detección a 254 nm

TABLA XXIX

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTIMICROBIANOS DE ACUERDO A GUÍAS DE LA FDA. DETERMINACIÓN EN TEJIDO INFECTADO

Antimicrobiano	LD µg/mL	LC µg/mL
Amoxicilina	0.50	1.6
Trimetoprim	0.15	0.3
Linezolid	0.15	0.3
Sulfametoxazol	0.15	0.3
Garenoxacina	0.15	0.3

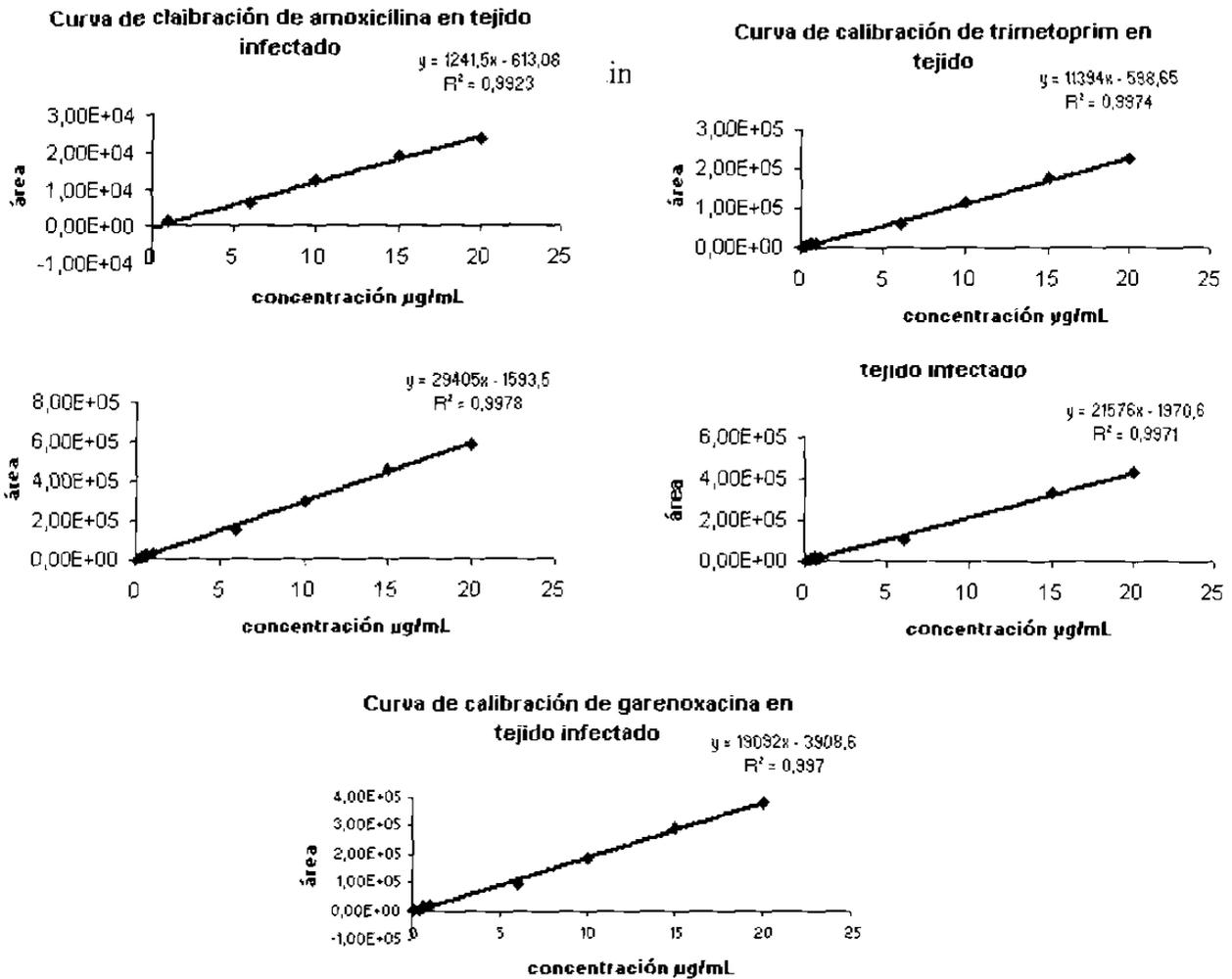


Figura 25. Curvas de calibración obtenidas para los antimicrobianos. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC₁₈. Fase móvil ATF 0.1%:Aceonitrilo. Flujo 1mL/min. Elución en gradiente. Detección UV 254 nm.

3.2.4.2 Precisión

En la tabla XXX se muestran los coeficientes de variación del método cromatográfico a tres niveles de concentración considerados como bajo (0.5 µg/mL), medio (1.66 µg/mL) y alto (5 µg/mL).

TABLA XXX
DETERMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN TEJIDO INFECTADO
PRECISIÓN A TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN

Antimicrobiano	Precisión intradía		
	RSD		
	0.6 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL
Amoxicilina	15	2.0	3.0
Trimetoprim	9.2	7.3	10.4
Linezolid	4.1	0.7	4.5
Sulfametoxazol	9.7	2.4	4.7
Garenoxacina	15	10.0	7.0

Fase estacionaria: Columna AtlantisC₁₈, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm

3.2.4.3 Exactitud

En la tabla XXXI se muestran los resultados de recuperación obtenidos aplicar el método de desproteinización antes descrito, utilizando 3 mL de acetonitrilo a la alícuota de tejido disuelta en 2 mL de buffer de fosfatos. Los porcentajes de recuperación fueron calculados utilizando el método de estándar externo a partir de las curvas de calibración elaboradas en matriz tejido.

3.2.4.4 Selectividad

Las muestras de tejido control (sin antimicrobianos) analizadas presentaron señales provenientes de la matriz, pero ninguna de ellas interfería con los antimicrobianos.

TABLA XXXI**RECUPERACIONES OBTENIDAS PARA ANTIMICROBIANOS. COMO PRECIPITANTE DE PROTEÍNAS SE UTILIZÓ ACETONITRILO.**

Antimicrobiano	0.4ug/mL %R	RSD	2 µg/mL %R	RSD	8 µg/mL %R	RSD
Amoxicilina	ND	ND	88±4	4	72±8	11
Trimetoprim	104 ±11	10	94±2	2	104±7	7
Linezolid	106±15	14	100±5	5	110±5	5
Sulfametoxazol	122±14	11	102±2	3	112±7	6
Garenoxacina	93±8	8	73±6	8	85±8	10

3.2.5 Aplicaciones**3.2.5.1 Aplicaciones en plasma**

En la figura 26 se muestra un cromatograma correspondiente al análisis de linezolid en plasma de ratón a los 120 minutos después de la administración del antimicrobiano. Se encontraron niveles de linezolid de hasta 2 µg/mL después de 160 minutos después de la administración del antimicrobiano

En la figura 27 se muestran los cromatogramas correspondientes al análisis de la garenoxacina en plasma de ratón por UV y por fluorescencia. Se realizaron determinaciones en plasma desde la administración (timepo cero) hasta los 180 minutos después de la administración de 3 diferentes dosis (25, 50 y 75 mg/kg de peso) de garenoxacina

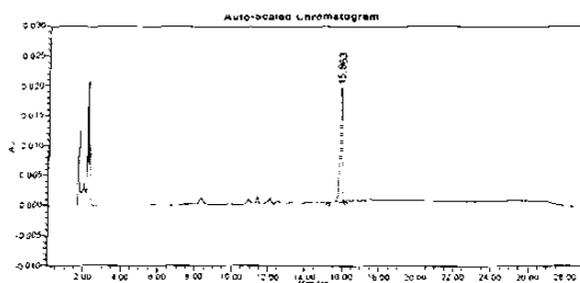


Figura 26. Análisis de linezolid en plasma de ratón. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisC18, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por UV 254 nm.

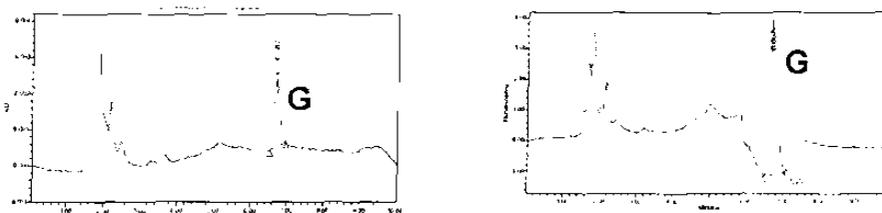


Figura 27. Análisis de Garenoxacina en plasma de ratón. El cromatograma de la derecha corresponde a la determinación por UV 254 nm. El cromatograma de la izquierda corresponde a la determinación por fluorescencia

3.2.5.2 Aplicaciones en tejido

La figura 28 corresponde al análisis en tejido de ratón infectado y tratado con la combinación linezolid-garenoxacina. Se observan las señales de linezolid y garenoxacina. El espectro de absorción confirma la presencia de estos analitos. La concentración calculada de estos dos antimicrobianos fue de 4.06 y 3.76 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente

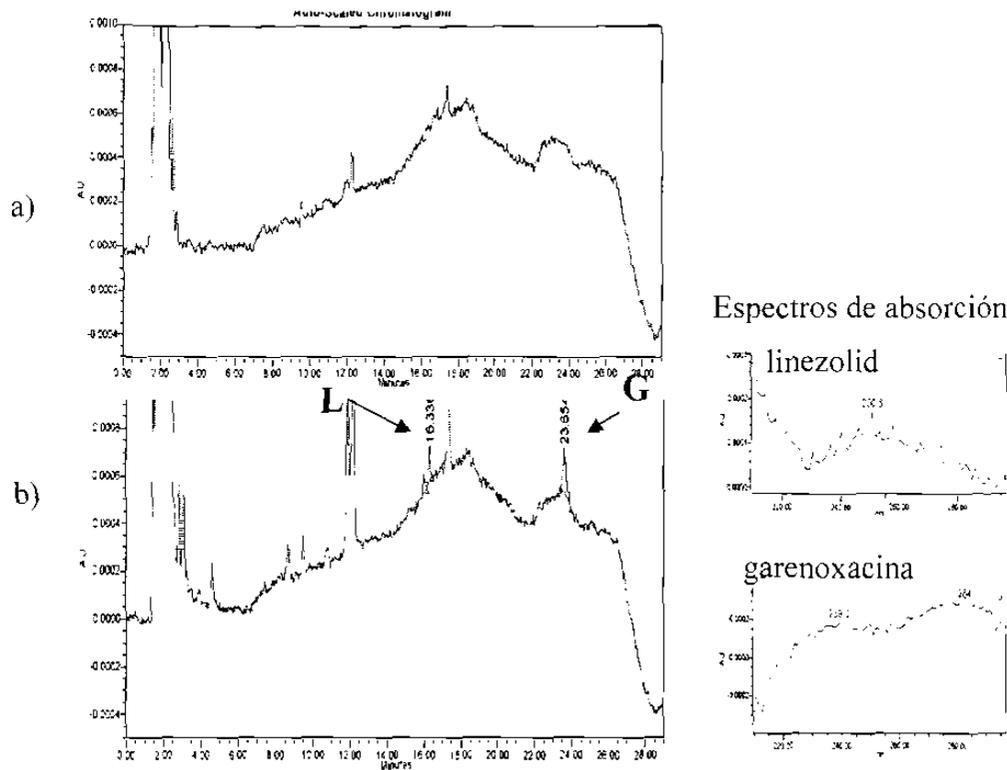


Figura 28. Análisis de linezolid y garenoxacin en tejido de ratón infectado con actinomicetoma y tratado con esta mezcla de antimicrobianos a) tejido blanco b) tejido con la mezcla. Los espectros de absorción de c) linezolid y d) garenoxacin se muestran en la parte izquierda del cromatograma

La figura 29 corresponde al análisis en tejido de ratón infectado y tratado con la combinación sulfametoxazol-trimetoprim-linezolid. Se observan las señales de sulfametoxazol y trimetoprim. El espectro de absorción confirma la presencia de estos analitos. Ambos analitos se encontraron por debajo de los límites de cuantificación establecidos para el método.

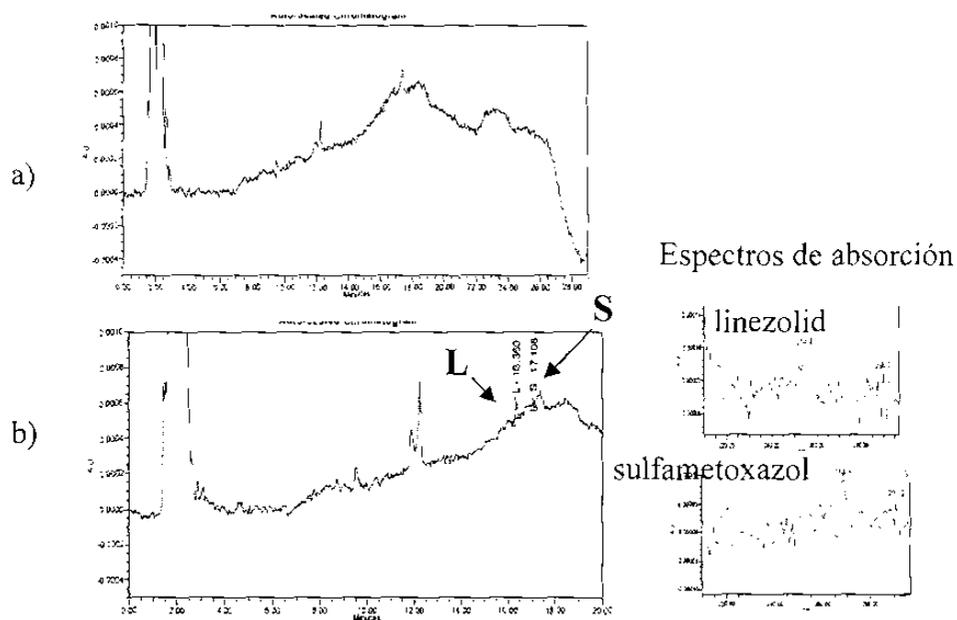


Figura 29. Análisis de trimetoprim-sulfametoxazol-linezolid en tejido de ratón infectado con actinomicetoma y tratado con esta mezcla de antimicrobianos a) tejido blanco b) tejido con la mezcla. Trimetprim menor al límite de detección del método. Los espectros de absorción se muestran a la izquierda del cromatograma

DISCUSIÓN

4.1 Desarrollo del método

Los antimicrobianos incluidos en el presente trabajo han sido determinados en forma individual, o algunos de ellos de manera simultánea, tal es el caso de la combinación sulfametoxazol-trimetoprim y amoxicilina-ácido clavulánico. El objetivo en este trabajo fue desarrollar un método que permitiera la determinación simultánea de todos ellos. Ya que todos presentan diferentes propiedades físicas y químicas, fue necesario probar diferentes condiciones, partiendo de las establecidas en la literatura para cada uno de ellos, hasta encontrar un sistema con fase móvil y fase estacionaria bajo el cual todos los antimicrobianos presentaran características de afinidad. Una vez que se encontraron las condiciones favorables para la separación, se procedió a la validación del método en plasma de ratón y en tejido de ratón infectado con actinomicetoma. También se optimizaron los procedimientos de preparación de muestras. Se demostró la aplicabilidad de los métodos desarrollados, ya que fueron analizadas muestras de plasma que contenían algunos de estos antimicrobianos, así como de tejido de ratones que habían recibido tratamiento contra actinomicetoma con combinaciones de estos antimicrobianos.

4.1.1 Separación cromatográfica.

Se probaron diferentes fases estacionarias y solventes para la elución. De acuerdo a la bibliografía, y como se confirmó con los diferentes sistemas que se trabajaron, tanto el linezolid, trimetoprim y sulfametoxazol son analitos que pueden ser eluidos bajo diferentes condiciones presentando picos cromatográficos fácilmente detectables y cuantificables; aunque en algunas de las condiciones probadas la forma del pico fue muy ancha o había poca resolución, ésta pudo ser modificada para obtener un pico simétrico. La amoxicilina, la garenoxacina, la amikacina y el ácido clavulánico son analitos de naturaleza polar, por lo que para lograr su retención en columnas de fase inversa se requiere el uso de la cromatografía de par iónico. La amoxicilina en todos los casos presentó un tiempo de retención cercano al tiempo muerto, indicativo de la poca retención en la columna cromatográfica, lo cual ocasionó que, al tratar de analizar este analito en plasma, su señal quedara dentro de la señal originada por el plasma. En todos los sistemas evaluados y las condiciones probadas, el mayor tiempo de retención que presentó la amoxicilina fue de 2.45 minutos.

En el primer sistema se utilizó una columna Hypersil ODS (100 x 2.1 mm DI) y como fase móvil trietilamina (TEA) y acetonitrilo. Esta fase es recomendada para la separación de sulfametoxazol y trimetoprim (Vree 1978). La TEA y el ácido acético se combinan para formar una alquilamina que actúa como par iónico y que es utilizada para la separación de compuestos básicos, como el trimetoprim. La fase móvil se preparó utilizando como fase A TEA al 0.3% y se ajustó el pH a 4 con ácido acético glacial, y fase B acetonitrilo, en una proporción de 75:25. Los tiempos de retención obtenidos cuando se analizó una mezcla de amoxicilina, trimetoprim, linezolid y sulfametoxazol fueron de 0.789, 1.49, 4.54 y 5.03 minutos

respectivamente. Se intentó aumentar la retención de la amoxicilina con el cambio en la proporción de las fases móviles así como la concentración de trietilamina, pero en todos los casos el tiempo de retención fue menor de un minuto. También se analizó la amikacina, pero no fue detectada en UV. Se procedió a trabajar evaluando los parámetros de precisión y de linealidad solo para los analitos trimetoprim, sulfametoxazol y linezolid en solvente y en plasma. El plasma presentó una señal ancha y con un tiempo de retención de 2 minutos. El t_R del trimetoprim en plasma fue inferior al que presentó en solvente, de tal manera que su señal quedó dentro de la del plasma. Además, la resolución entre linezolid y sulfametoxazol también disminuyó. Después de esto se probó el cambio de condiciones para tratar de aumentar la retención, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que el sistema fue descartado.

Los antimicrobianos amoxicilina, sulfametoxazol y trimetoprim han sido analizados utilizando como fase móvil buffer de fosfatos a un pH de 6.5 - 7 en combinación con acetonitrilo (Ronn, 1999, Dudley 1984) metanol con agua (Lee 1984) o con buffer de fosfatos (Abounassif 1991). Por esta razón, se analizó la mezcla de antimicrobianos tanto con metanol como con acetonitrilo en combinación con buffer de fosfatos. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que se obtuvieron picos cromatográficos anchos para algunos antimicrobianos así como poca retención para la amoxicilina, así que también fue descartado este sistema.

Cromatografía de par iónico

La Cromatografía de fase reversa puede ser utilizada para la separación de compuestos iónicos, haciendo uso de la supresión de la ionización. Este método está basado en el ajuste del pH de la fase móvil para obtener un analito no ionizado. Así,

cuando se tienen ácidos débiles o bases débiles el pH puede ser ajustado para tener estas especies en su forma no ionizada. Sin embargo, existe una limitación dada por la inestabilidad de la sílica que sirve como soporte para la fase estacionaria: solo se permite un intervalo de trabajo de valores de a pH entre 2 y 8. Si el pH es menor de 2 podría ocurrir una hidrólisis de los grupos funcionales de la fase unida; si el pH es mayor de 8 la sílica puede comenzar a disolverse (Quattrocchi, 1992).

Cuando no puede utilizarse el método de supresión de la ionización, las sustancias de naturaleza fuertemente ácida o básica pueden ser analizadas utilizando la cromatografía de par iónico (IPC). En este tipo de cromatografía se ajusta el pH de la fase móvil para mantener el estado ionizado del compuesto, (para ácidos el pH adecuado es de 7.5 y para bases es de 3.5) y además se añade en la misma fase móvil un contraión, es decir, una especie de carga contraria a la del analito. El mecanismo de retención de IPC se explica al menos en tres modelos: el primero de ellos establece que se forman pares iónicos en la fase móvil (eluyente) y que estos pares iónicos experimentan la retención en la columna cromatográfica. El segundo establece que los reactivos de par iónico se adsorben en la fase estacionaria y después actúan como sitios de intercambio iónico. En el tercer modelo se enfatiza la importancia de las atracciones tanto de adsorción como electrostáticas, para lograr la retención en cromatografía de fase reversa de estos pares iónicos (Bidlemeier 1992).

La cromatografía de par iónico presenta como ventajas el obtener tiempos de separación de los analitos cortos con resultados altamente reproducibles, los picos cromatográficos son angostos y además se puede realizar la separación simultánea de

analitos ionizados y no ionizados ya que la retención de estos últimos no es afectada ni por la presencia ni por la concentración del reactivo de par iónico. Cuando se requiere trabajar con este tipo de cromatografía deberá tenerse en cuenta que la columna que se utilice se reserve solo para esa aplicación ya que la adsorción del agente par iónico puede ser irreversible. La concentración del contraión es de 5 a 20 mM y además se requieren varios volúmenes de columna para lograr la estabilidad de la columna antes de ser utilizada en la separación de los analitos (Quattrocchi 1992, Bidligneyer 1992)

A pesar de que se tienen reportes de que la separación de la amoxicilina, junto con el ácido clavulánico, se ha llevado a cabo sin la introducción de agentes par iónico, en nuestro caso, aunque se probaron las condiciones descritas, no se logró la retención de estos compuestos. Por lo anterior, el siguiente paso a considerar fue el uso de la cromatografía de par iónico. Además de la amoxicilina, el análisis de las quinolonas también requiere del uso de par iónico para su separación (Krauwinkel, 1993, Yuan 1995, Liang 2002, Borner 1999, Colunga 2005).

Diferentes reactivos han sido utilizados para la formación de pares iónicos. Para la amoxicilina se ha utilizado el tetrabutilamonio (TBA), como fosfato o como cloruro, el dodecilsulfato de sodio (SDS), y el ácido metanosulfónico. El pH de la fase móvil cuando se trabajó con el tetrabutilamonio fue de 6-7, por lo que la amoxicilina estaba ionizada. Cuando se utilizó el ácido metanosulfónico no se especifica el pH de trabajo, y en el caso del dodecilsulfato de sodio, el pH de trabajo fue de 4.9, para asegurar que la amoxicilina estuviera en la forma ionizada. En el

caso de las quinolonas, el agente par iónico que se ha utilizado es sulfato de tetrabutilamonio a una concentración de 0.01 M.

En este trabajo se eligió el reactivo fosfato de tetrabutilamonio (TBA) 0.01 M, el cual se añadió a la fase móvil A, constituida por buffer de fosfatos 0.01 M pH de 7.2. La fase B fue acetonitrilo. En un principio se utilizó como fase estacionaria una columna C₁₈, pero durante el desarrollo del método, los cromatogramas que se obtenían presentaban picos cromatográficos asimétricos y todos presentaban un “hombro”, muy constante y característico, lo cual indicó la pérdida de eficiencia de la columna, por lo que fue descartada.

La siguiente fase estacionaria que se utilizó fue una columna XTerra. Esta columna presenta la característica de una tecnología de partícula híbrida (polimérica) lo cual amplía el margen de pH al cual puede trabajarse. La fase estacionaria incorpora además un grupo polar que permite obtener mejores formas de pico (simétrico y estrecho) y el uso de fases 100% acuosas (Waters Inc. 2003-2004). El análisis de los antimicrobianos en forma individual mostró lo siguiente: el ácido clavulánico presentó pobre retención y además una señal muy pequeña con respecto a la concentración utilizada, es decir, una baja sensibilidad. A un pH de 7.2 (buffer de fosfatos que se había estado utilizando) la amoxicilina tendría carga negativa (pKa de 2.7) por lo que la función del TBA sería formar el par iónico y por lo tanto se esperaría la retención de este antimicrobiano, sin embargo, como en los casos anteriores, se presentó pobre retención además de la baja respuesta de este analito. En el caso del trimetoprim se presentó también poca retención y, en el caso de linezolid y garenoxacina, el pico cromatográfico fue muy ancho y los tiempos de

retención para ambos estaban muy cercanos. Una vez que se identificó el orden de elución, se realizó la mezcla de los antimicrobianos y se procedió a analizarla. En lo que respecta al ácido clavulánico, no se logró una mayor retención. Para la amoxicilina, se consiguió que tuviera una mayor retención en la columna, trimetoprim tenía un buen tiempo de retención, el linezolid y el sulfametoxazol tenían una resolución con un valor menor del óptimo (1.5) por lo que debía mejorarse, y en cuanto a la garenoxacina, se retenía fuertemente por la fase estacionaria. De acuerdo a las recomendaciones para cuando se utiliza un agente par iónico, antes de su uso la columna debe equilibrarse con 4 a 10 veces el volumen de la misma, para lograr la saturación de la fase estacionaria. Posteriormente, cada vez que se utilice, es necesario pasar la fase móvil, a un flujo normal, por dos a tres horas, para lograr el equilibrio y comenzar a trabajar. En nuestro caso, la columna se dejó la noche anterior con flujo de 0.2 mL/min y, antes de trabajar, un tiempo de equilibrio de 2 a tres horas a un flujo de trabajo (0.4 mL/min). Esto implicaba un gasto considerable de fase móvil. El reactivo TBA tiene un alto costo, la concentración a la que se utilizó (0.01 y 0.015 M) requería de un peso mayor de 2 g/L. También se comprobó que la vida de la columna fue relativamente corta, ya que durante el desarrollo de la separación, la columna comenzó a perder eficiencia y la presión del sistema comenzó a elevarse.

Antes de recurrir a una nueva columna, se plantearon otras alternativas de análisis. Se decidió probar una columna Atlantis dC₁₈ de fase reversa. Las columnas Atlantis tienen una óptima combinación de densidad de grupo funcional C₁₈, y un recubrimiento de grupos silanoles residuales de la partícula de soporte (“endcapping”) lo cual permite la retención de compuestos polares sin deformación

del pico, así como el uso de fases móviles 100% acuosas. Las características anteriores permiten que se lleven a cabo determinaciones de analitos que requieren de par iónico para su separación (Waters Inc. 2003-2004). Se decidió probar el análisis de la mezcla de antimicrobianos sulfametoxazol-trimetoprim-garenoxacina utilizando la columna anteriormente descrita. Como fase móvil A buffer de fosfatos 0.01 M a pH 4 y fase móvil B acetonitrilo. Para la elución se utilizó un programa de gradiente. Los resultados obtenidos permitieron optimizar y validar el método cromatográfico en plasma de ratón.

El método previamente desarrollado fue utilizado para la determinación de garenoxacina en muestras de plasma de ratón BALB/c a los que se administró el antimicrobiano en tres diferentes dosis (25, 50 y 75 mg/kg), y fueron tomadas muestras de plasma en diferentes tiempos (0, 20 y 40 minutos y 1, 2, 3, 4 y 6 horas después de la administración). Estas muestras fueron procesadas para la determinación de los niveles de garenoxacina. Con los datos obtenidos se determinó la cinética de este antimicrobiano.

Posteriormente se procedió a preparar una mezcla con los siguientes antimicrobianos: amoxicilina, trimetoprim, sulfametoxazol, linezolid y garenoxacina. El cromatograma correspondiente mostró la primera señal con un tiempo de retención de 4.5 minutos y el resto de las señales dentro de los siguientes 30 minutos. Las señales fueron identificadas mediante sus espectros de absorción y se confirmó que se trataba de los cinco antimicrobianos componentes de la mezcla. Por lo anterior, se adoptó la columna Atlantis dC₁₈ para establecer las condiciones óptimas de análisis y posteriormente la validación, tanto del sistema como de los métodos en

plasma y en tejido. En comparación con los otros sistemas cromatográficos, el utilizar la fase estacionaria de la columna Atlantis resultó en un menor tiempo necesario para estabilizar la columna, un tiempo de análisis relativamente corto para la separación de los cinco componentes así como una mayor rapidez y facilidad en la preparación de la fase móvil. Cabe mencionar también que el ácido trifluoroacético puede ser guardado a 4 °C y ser utilizado continuamente durante un mes o más tiempo, sin que pierda estabilidad, solo se recomienda la filtración previa a su uso.

4.1.2 Análisis de Ácido clavulánico

Con respecto al ácido clavulánico, también fue inyectado en forma individual. El cromatograma mostró una señal con muy baja respuesta y a un tiempo de retención relativamente corto que, si bien podía ser incluido en la mezcla y en la validación del sistema, al analizar el plasma su señal quedaría dentro de la señal propia del plasma. No se logró aumentar su retención aún disminuyendo la proporción de solvente orgánico. A pesar de que al ácido clavulánico no se incluyó en el método desarrollado debido a su baja respuesta en UV, pudo comprobarse que su señal no interfería con el resto de los otros antimicrobianos.

4.1.3 Análisis de Amikacina

Como se mencionó en procedimientos, la amikacina fue derivatizada utilizando el reactivo OPA/2ME. Se realizó la determinación de este antimicrobiano tanto en estándares como en muestras de plasma adicionadas. Los resultados obtenidos con estándares demostraron una baja respuesta del derivado fluorescente. Además, cuando se realizó el análisis en plasma libre de antimicrobianos se obtuvieron un gran número de señales alrededor del tiempo de retención de la

amikacina. En el cromatograma del análisis plasma-amikacina apareció una señal muy cercana a la de amikacina que la mayoría de las veces no permitía resolverse. La sensibilidad del método OPA/2 ME no permitió cuantificar señales a niveles inferiores a 10 µg/mL. Otro inconveniente que se presentó fue la poca estabilidad de los derivados. (Salazar 1993). Por ello, se propuso desarrollar un método con posibilidades de realizarse de una manera más rápida y sencilla. Actualmente se está desarrollando un trabajo de tesis de maestría en donde se propone la determinación de amikacina por espectrofluorimetría.

4.1.4 Métodos de detección

Análisis por Ultravioleta

La detección de los antimicrobianos se realizó a 254 nm. Si bien, no es la longitud de onda de máxima absorción para todos ellos, los resultados obtenidos de sensibilidad (límite de detección y cuantificación) son adecuados para la determinación de antimicrobianos tanto en plasma como en tejido.

Análisis por fluorescencia

Las referencias señalan que el sulfametoxazol presenta baja intensidad de fluorescencia (Cruces-Blanco 1978), mientras que para linezolid no se cuenta con referencias de su determinación utilizando detección por fluorescencia. En el caso de garenoxacina, su determinación se ha realizado utilizando fluorescencia a longitudes de onda semejantes a las utilizadas en este trabajo (Xuan 2001). En nuestro caso, si bien el sistema fue validado tanto para garenoxacina como para linezolid y sulfametoxazol, se observó una muy baja sensibilidad para estos últimos.

Para establecer las longitudes de onda de emisión y excitación de los antimicrobianos, se trabajó en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS 45 con soluciones individuales de los antimicrobianos preparadas en fase móvil. Los valores óptimos de longitud de onda de excitación y de emisión para linezolid fueron 270/540nm y para sulfametoxazol 310/617nm respectivamente. Estos valores fueron los que se establecieron para obtener los cromatogramas de fluorescencia para ambos compuestos, sin embargo, la señal que presentaban los compuestos fue muy pequeña, debido probablemente a la influencia de la fase móvil. Posteriormente, se modificaron las longitudes de onda logrando obtener señales que si bien, resultaron más intensas, no eran mejores que las obtenidas por UV. Tomando en cuenta que se obtuvo una mayor sensibilidad por UV que por fluorescencia, tanto para linezolid como para sulfametoxazol, se decidió continuar la validación del método de fluorescencia solo para garenoxacina.

4.2 Tratamiento de muestras

Para el tratamiento del plasma se ha reportado el uso de diferentes agentes para precipitar proteínas (acetonitrilo, ácido perclórico, metanol) y en diferentes volúmenes adicionados al suero o plasma (Borner 2001, Tobin 2001, Menelaou 1999). En nuestro caso, la precipitación de proteínas se evaluó utilizando como agentes precipitantes acetonitrilo, metanol y ácido trifluoroacético. Al analizar los datos, no se encontró diferencia significativa entre metanol o acetonitrilo, pero los porcentajes de recuperación fueron significativamente menores cuando se utilizó ácido trifluoroacético. Esto podría deberse a que el ATF por su naturaleza ácida ocasiona pérdida de los antimicrobianos, sobre todo de la amoxicilina (Quattrocchi,

1992, Menelaou 1999). Por lo tanto se eligió el acetonitrilo como agente precipitante de proteínas.

Con el fin de utilizar la menor cantidad posible de plasma, se probó utilizar 50 y 100 μL para establecer las condiciones óptimas de preparación de muestra y verificar que no hubiera diferencia entre ellas. Los resultados de recuperación y precisión obtenidos con ambos volúmenes no mostraron diferencias significativas, por ello se continuó trabajando con 50 μL . Con las condiciones establecidas se procedió a validar el método en matriz plasma.

Para el tratamiento del tejido de ratón infectado con micteoma, se utilizó una modificación del método reportado por Luo 2001 y Brandsteterova 1996. Se probó realizar la extracción con dos diferentes valores de pH (7.2 y 4) para evaluar el efecto en la extracción. Los resultados obtenidos fueron similares. La desproteinización se realizó utilizando acetonitrilo en un volumen de 1.5 veces el volumen del buffer utilizado para la homogenización. Debido a que el contenido de proteínas en tejido con proceso de infección es mucho mayor que en plasma, se consideró conveniente realizar una segunda precipitación utilizando una relación 1:1 con respecto al sobrenadante obtenido.

Cabe mencionar que para el tratamiento de plasma y de tejido se ha utilizado, además de la precipitación de proteínas, la extracción en fase sólida (Brandsteterova 1996, Chulavatnatol 1993, Lee 1983). Este último tratamiento se consideró como alternativo y se decidió probar como primera opción la precipitación. Se consideró que si no se obtenían resultados aceptables, la indicación sería probar otro método.

Los resultados de recuperación obtenidos utilizando precipitación de proteínas estuvieron dentro de los límites señalados por los criterios establecidos para la validación de métodos (Guías de validación de la FDA, 2001) así como la precisión de los procedimientos, de manera que fue establecido como método de preparación de plasma. Este método presentó la ventaja de un procesamiento de muestras más rápido, sencillo y menos costoso.

4.3 Validación

4.3.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación

La evaluación de la linealidad se realizó con la regresión lineal y el coeficiente de correlación, como también evaluando el coeficiente de variación de los factores de respuesta (menor del 15%). En nuestro caso, los coeficientes de variación (RSD) tanto para sistema, matriz plasma y tejido, se encontraron menores del 15%.

El factor de respuesta fue calculado como la relación entre la respuesta y la concentración. Este cálculo demostró la baja respuesta de la amoxicilina (736) comparada con el resto de los antimicrobianos. Se han reportado límites de detección hasta de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ para este antimicrobiano, pero en esos casos se ha utilizado una derivatización y detección por fluorescencia (Mascher 1998). Los límites de detección encontrados en nuestro trabajo son comparables a otros reportados en la literatura en los que se emplea detector UV sin derivatización (Mahmad 1991, Suvatna 1993). En cuanto a los otros antimicrobianos; considerando las dosis que se

administran y los niveles en suero que se han reportado, los límites de detección también son satisfactorios (Menelaou 1999, Peng, 1999, Ehrlich 2001, Tobin 2001).

Los límites de detección y cuantificación fueron establecidos por medio de cálculo (ecuación 7 y 8). Sin embargo, estos valores mas bajos en comparación con lo que experimentalmente pudo observarse, por lo que lo más adecuado para reportar serían los límites establecidos experimentalmente.

Cabe mencionar que los límites de cuantificación establecidos permiten la determinación de estos antimicrobianos a niveles plasmáticos iguales a la concentración mínima inhibitoria reportada para *Nocardia brasiliensis*, en el caso de la amoxicilina, y aún inferiores a este valor para los otros antimicrobianos.

4.3.2 Precisión

La precisión intradía se obtiene realizando mediciones de las soluciones en el mismo día, mientras que la precisión interdía se obtiene con mediciones de las soluciones en diferentes días. Las condiciones de análisis deberán mantenerse iguales: misma fase móvil, volumen de inyección, temperatura, etc). Es de esperar que se obtenga una mayor precisión de análisis cuando éste se realiza el mismo día que en diferentes día, ya que en este caso se introducen nuevas variables. Los coeficientes de variación obtenidos en este trabajo están de acuerdo con lo mencionado anteriormente, no así para la garenoxacina (tabla XII y XIII) y el sulfametoxazol (tablas XXIII y XXIV). Esto pudo deberse a la presencia de un error aleatorio en uno de los datos.

Para todos los casos medidos (precisión intradía e interdía), los coeficientes de variación obtenidos se encuentran por debajo del valor límite establecido por la FDA en su guía de validación.

4.3.3 Exactitud

En lo que se refiere a la exactitud, evaluada como recuperación, todos los antimicrobianos presentaron recuperaciones dentro del intervalo del 80-120% del valor nominal excepto en el caso de la amoxicilina. Sin embargo, en todos los casos la precisión del método fue aceptable (coeficientes de variación menor del 15%), por lo que puede considerarse que la desproteínización del plasma con acetonitrilo en una proporción 1:4 resultó un método adecuado. Este método también resultó adecuado para el procesamiento de tejido ya que los resultados obtenidos de igual manera presentaron valores dentro de los criterios de validación mencionados anteriormente.

Las curvas de calibración obtenidas con estándares preparados en buffer y en matriz plasma resultaron aparentemente muy semejantes. El análisis de los datos de recuperación, a un nivel de concentración, obtenidos en ambas curvas demostró que para trimetoprim, linezolid, sulfametoxazol y garenoxacina no existe efecto de matriz, mientras que para amoxicilina sí existe un efecto de matriz multiplicativo observado por un cambio significativo en el valor de la pendiente de las curvas de calibración. Por lo tanto, cuando se realicen determinaciones de este último antimicrobiano, es recomendable trabajar con curva de calibración elaborada en matriz. En lo que respecta a tejido infectado, en todos los casos hubo diferencia significativa entre los valores de recuperación obtenidos con la ecuación de regresión

de la curva en matriz, con respecto a los obtenidos con la curva de estándares preparados en buffer. Por lo tanto, al igual que para la determinación de amoxicilina en plasma, se recomienda que al trabajar con tejido de ratón infectado con micetoma se realice también en una curva elaborada en matriz.

4.3.4 Robustez

Los resultados obtenidos del diseño experimental establecido para evaluar robustez demostraron que todos los factores modificados afectan al método. Los factores que afectan más significativamente fueron el flujo (produce una pérdida de la resolución entre el sulfametoxazol y el linezolid) y el solvente en el cual se encuentran los antimicrobianos. La temperatura y la composición de la fase móvil (% de acetonitrilo y % de ácido trifluoroacético), también afectaron, aunque en menor grado.

4.3.5 Estabilidad

Todos los antimicrobianos en estudio, excepto la amoxicilina son estables como mínimo dos semanas, tiempo después del cual las señales obtenidas se encuentran fuera de los límites establecidos ($\pm 2ds$). Sin embargo, en forma individual pueden ser estables hasta por 30 días. Debido probablemente a interacciones entre ellos puede ser que disminuya la estabilidad. Con respecto a esto, la amoxicilina presentó los mayores problemas ya que su degradación en la mezcla de trabajo ocurría dentro de los siguientes 4 días después de su preparación; esto se observó por una notable disminución del área de pico, así como también por la aparición de otras señales y particularmente una de ellas muy cercana a la señal del trimetoprim.

4.4 Aplicabilidad

4.4.1 Determinaciones en plasma

El método desarrollado se aplicó para determinar las concentraciones de linezolid en plasma de ratón a diferentes tiempos después de la administración de este antimicrobiano. Las muestras fueron congeladas hasta su procesamiento. Fueron determinadas concentraciones mínimas de 0.5 µg/mL. Esto demostró la aplicabilidad del método desarrollado ya que los datos obtenidos fueron procesados para establecer la farmacocinética de este antimicrobiano a diferentes dosis de administración. Otra de las determinaciones que se realizaron fue la de garenoxacina. De igual manera, los datos obtenidos fueron procesados para establecer la farmacocinética de este antimicrobiano.

4.4.2 Determinaciones en tejido

Para demostrar la aplicabilidad del método propuesto, se analizaron muestras de tejido de ratón infectado con actinomicetoma posteriores a la administración de antimicrobianos. Las mezclas administradas fueron: Trimetoprim, Sulfametoxazol, Linezolid, por un lado; y, por otro lado, Linezolid con Garenoxacina. La combinación sulfametoxazol-trimetoprim es el tratamiento de elección para actinomicetoma. Linezolid ha demostrado una actividad *in vitro* contra *N. brasiliensis* muy alta. Este antimicrobiano presenta un mecanismo de acción único, y diferente de la combinación SXT, de tal forma que la combinación sulfametoxazol-trimetoprim-linezolid podría ser un esquema de tratamiento con posibilidades de presentar gran eficacia en el tratamiento contra actinomicetoma.

Otra de las mezclas utilizadas fue linezolid-garenoxacina. Estos dos antimicrobianos tienen mecanismos de acción diferentes ya que, mientras linezolid actúa inhibiendo el proceso bacteriano de síntesis de proteínas previniendo así la formación del complejo funcional de iniciación de síntesis, la garenoxacina actúa sobre la DNA girasa, enzima esencial para la replicación, transcripción y reparación del DNA bacteriano. La actividad *in vitro* de la garenoxacina en contra de *N. brasiliensis* fue probada por Vera-Cabrera y col. Este antimicrobiano presentó una actividad alta, con MIC₉₀ de 0.5 µg/mL (Vera-Cabrera 2003). Por lo anterior, la combinación linezolid-garenoxacina podría tener grandes posibilidades de ser un esquema también eficaz para el tratamiento contra actinomicetoma.

Para cada antimicrobiano, la dosis administrada debe producir una concentración de éste en plasma mayor que la concentración mínima inhibitoria (MIC) establecida contra *N. brasiliensis*, y esta concentración deberá de mantenerse por encima de esta MIC hasta antes de la siguiente administración del antimicrobiano. Tomando en cuenta lo anterior, se seleccionaron las dosis que se debían administrar de cada antimicrobiano.

En plasma no se detectaron las señales de los antimicrobianos administrados. Esto pudo deberse a que el tiempo transcurrido entre la última administración y la toma de la muestra fue demasiado prolongado (13 horas) y los niveles plasmáticos de los antimicrobianos ya no se encontraban dentro de los límites de detección establecidos por nuestro método. El tiempo de vida media reportado en humanos es de 11 y 10 horas para el trimetoprim y el sulfametoxazoles, mientras que para el linezolid es de 4 a 6 horas.

En el caso de la mezcla linezolid-garenoxacina, se encontraron concentraciones de 4.06 $\mu\text{g/mL}$ para Linezolid y 3.76 $\mu\text{g/mL}$ para Garenoxacina. Para el esquema STX-Linezolid las señales detectadas están por debajo de los límites de cuantificación establecidos por nuestro método. También se analizaron tejidos de ratón infectado pero que no presentaba proceso de inflamación debido al actinomicetoma (patita de ratón del lado contrario al micetoma) y en estas muestras no se encontraron señales de los antimicrobianos. Los resultados anteriores de la deposición de antimicrobianos en el área infectada y con proceso de inflamación, muestran la presencia de los antimicrobianos en el proceso de inflamación. Hasta el momento no se tiene información acerca de la deposición de estos antimicrobianos en tejido de ratón infectado con actinomicetoma. Aunque los datos encontrados en el análisis realizado muestran buenos resultados es importante tomar en cuenta que solo demuestran que el método desarrollado es aplicable y que esto representa una primera etapa en el estudio de la farmacodinamia de estos antimicrobianos en tejido infectado.

5**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS****5.1 Conclusiones**

1.- El método desarrollado y validado por CLAR con detección UV es rápido, sencillo, sensible y preciso y puede ser aplicado para la determinación, individual o simultánea, de amoxicilina, garenoxacina, linezolid sulfametoxazol y trimetoprim en plasma y en tejido de ratón infectado con actinomicetoma.

2.- El método desarrollado y validado por CLAR con detección por fluorescencia presenta mayor sensibilidad para la determinación de garenoxacina, no así para linezolid y sulfamteoxazol. El método desarrollado para garenoxacina puede ser aplicado para la cuantificación de este antimicrobiano en plasma y en tejido de ratón infectado con actinomicetoma.

3.- Los métodos establecidos para la preparación de muestras (plasma o tejido) son precisos, sencillos, rápidos y económicos

4.-El sistema acetonitrilo-ac.trifluoroacético con la columna Atlantis dC₁₈ resulta adecuado para el análisis cromatográfico de analitos no polares y aquellos que requieren de agente par iónico. Es necesario mantener las condiciones de análisis controladas ya que tienen influencia importante en el desempeño del método

5.2 Perspectivas

1. Aplicar el método desarrollado en el estudio de los antimicrobianos analizados para incrementar el conocimiento de su farmacocinética y farmacodinamia.
2. Desarrollar un método con mayor sensibilidad que permita la determinación de amikacina a un nivel de concentración menor que la concentración mínima inhibitoria (MIC) establecida para Nocardia.
3. Desarrollar un método con mayor sensibilidad para la determinación de ácido clavulánico.
4. Desarrollar las técnicas de tratamiento de muestra en otras matrices biológicas, particularmente en hueso de ratón.
5. Implementar el método desarrollado para la cuantificación de nuevos antimicrobianos propuestos para el tratamiento de actinomietoma.

BIBLIOGRAFÍA

- Abounassif M., Abdel-Moety E., Mohamed M., Gad-Kariem E. Liquid chromatographic determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical preparations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 9:731-735.(1991).
- Agbaba D., Radovic A., Vladimirov S., Zivanov-Stakic D. Simultaneous TLC Determination of Co-trimazole and Impurities of Sulfanilamida and Sulfanilic Acid in Pharmaceuticals. Journal of Chromatographic Science. 34:460-464. (1996).
- Arenas R. Micología Médica Ilustrada. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México, D.F.1993. pp 131-148
- Bindlmeier B.A. Practical HPLC Methodology and Applications. John Wiley & Sons. 1992. pp 153-157
- Borner K. Determination of linezolid in human serum and urine by high performance liquid chromatography. International Journal of Antimicrobial Agents. 18:253-258. (2001).
- Brandsteterova E., Kubalec P., Simko P., Machakova L. SPE-HPLC determination of trimethprim in tissue samples. Pharmazie (short communication). 51: 984-986 (1996).
- Cantú Garza H. A. Características Epidemiológicas y Clínicas de los pacientes con Micetoma en la consulta de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José E González. Tesis para grado de especialista. Febrero 2004.
- Christian G. D. Analytical Chemistry. 5th Edition. Editorial John Wiley and Sons, N.Y. 1994. pp 36-37
- Chromatography Columns and Supplies Catalog. Waters 2003-2004.
- Colunga González L. Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos para la determinación de Gatifloxacin en Líquido Seminal de pacientes con infertilidad. Tesis de Doctorado. Febrero 2005.

- Connor S., Everett J.R. High Resolution ^1H NMR Spectroscopic Studies of the Metabolism and Excretion of Ampicillin in Rats and Amoxicillin in Rats and Man. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*. 46: 128-134. (1994).
- Cruces-Blanco C., Segura Carretero A., Fernández Peinado S., Román Ceba M., Fernández Gutiérrez A. Determination of the antibacterial drug sulfamethoxazole in pharmaceutical preparations containing trimethoprim by spectrofluorimetry after derivatization with fluorescamine. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 365: 444-447. (1999).
- Chulavatnatol S., Charles B. High-performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in urine using solid phase, ion-pair extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*. 615: 91-96 (1993).
- Daldovisio J., Pankey G. In vitro Suceptibility of *Nocardia asteroides* to Amikacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 13,;128-129.(1978).
- De Baere S., M. Cherlet, Baert K, P. De Backer. Quantitative Analysis of Amoxicillin and its mayor metabolites in animal tissues by Liquid Chromatography Combined with Electrospray ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical. Chemistry*. 74, 1393-1401. (2002).
- Dudley, Levitz R, R. Quintillani, J. Hickingbotham, C. Nightingale. Pharmacokinetics of Trimethporim and Sulfamethoxazole in serum and cerebrospinal Fluid of Adult Patients with Normal Meninges. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 26: 811-814. (1984).
- Ehrlich M. et al. A new and rapid method for monitoring the new oxazolidinone antibiotic linezolid in serum and urine by high performance liquid chromatography-integrated sample preparation. *Journal of Chromatography*. 755:373-377. (2001).
- Elmas M., Tras Bas., Yazar E., Umitli S., Birdane O. The disposition of Sulfamethoxazole-Trimethoprim combination after intrauterine administration in post-partum lactating cows. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 55:1-4. (2000).
- Foulstone M, Reading C. Assay of Amoxicillin and Clavulanic Acid, the

- components of Augmentin, in Biological Fluids with High Performance Liquid Chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 22:753-762. (1982).
- Gee T., Ellis R., Marshall G., Andrews J., Ashby J., Wise R. Pharmacokinetics and tissue penetration of linezolid following multiple oral doses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 1843-1846. (2001).
- Godman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Décima Edición. Volumen II. Editorial Mc. Graw-Hill. 2003.
- Gombert M. Suceptibility of *Nocardia asteroides* to various antibiotics, including newer beta-lactams, trimethoprim-sulfamthoxazole, amikacin, and N-formidoyl thienamycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 21:1011-1012. 1982).
- Gómez-Flores A., Welsh O., Said Fernández S., Lozano-Garza G., Tavarez A., Vera- Cabrera L. In vitro and In vivo Activities of Antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:832-837 (2004).
- Gringauz A. Introduction to Medicinal Chemistry. How drugs act and why. Wiley-VCH Inc., 1997
- Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Mayo 2001 <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- Hayakawa H., Fukushima Y., Kato H., Fukumoto H., Kadota T., Yamamoto H., Kuroiwa H., Nishigaki J., Tsuji A. Metabolism and disposition of novel des-fluoro quinolone in experimental animals and interspecies scaling of pharmacokinetic parameters. *Drug Metabolism and Disposition*. 31:1409-1418. (2003).
- Hoizey G., Lamiable D., C. Frances, Trenque T. Kaltenbach M., Denis J., Millart H. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC and UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 30:661-666. (2002).

- Isoherranen & Soback. Chromatographic Methods for Analysis of Aminoglycoside Antibiotics. Journal of AOAC International. 82: 1017-1045. (1999).
- Krauwinkel J., Volkers-Kamermans N.J., van Zijtveld J. Determination of amoxicillin in human plasma by high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. Journal of Chromatography. 617: 334-338. (1993).
- Kutscha-Lissberg F., Hebler U., Muhr G., Köller M. Linezolid Penetration into Bone and Joint Tissues Infected with Methicillin-Resistant Staphylococci. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 47: 3964-3966. (2003).
- Lavalle P. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. Gaceta Médica de México. Tomo XCVI 1996. 545-569
- Lee T., Brooks M.A. High Performance Liquid Chromatography determination of amoxicillin in human plasma using a bonded phase extraction. Journal of Chromatography, Biomedical Applications. :429-435 (1984).
- Liang H., Kays M., Sowinski K. Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cianoxacin by high performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma. Journal of Chromatography B. 772 : 53-63. (2002).
- López-Martínez L., López-de Alba P. L., de-León-Rodríguez L.M., Yépez Murieta M.L. Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulfamethoxypyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method. Journal of Pharmaceutical and Biomedycal Analysis. 30:77-85. (2002).
- López-Martínez, R., L. Méndez-Tovar J., Lavalle P., Welsh O., Saul A., Macotela-Ruiz. E. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. Gaceta Médica Mexicana 128:477-481. (1992).
- Luo W., Ang C. Determination of Amoxicillin Residues in Animal Tissues by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. Journal AOAC International. 83: 20-26. (2000).

- Mahedero, T. Galeano, S. Galán Pascual. Determination of Sulfamethoxazole by photochemically induced fluorescence in drugs and milk. Talanta. 57:1-6. (2002).
- Maitra S., Yoshikawa T., Stevn C., Guze L., Schotz M. Amikacin Assay in Serum by High-Performance Liquid Chromatography. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 14:880-885. (1978).
- Marques de Cantú M.J. Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana de México S.A. de C.V. 1991 pp 361-373.
- Mascher H. Determination of amoxicillin in human serum and plasma by high performance liquid chromatography and on-line postcolumn derivatization. Journal of Chromatography A. 812:221-226. (1998).
- Menelaou A., Somogyi A., Barclay M., Bochner F. Simultaneous quantification of amoxicycillin and metronidazole in plasma using high performance liquid chromatography with photodiode array detection. Journal of Chromatography B. 731: 261-266.(1999).
- Miller J., Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª Edición. Ed. Pearson Prentice Hall. Capítulo 5.
- Mohamed G., Spectrophotometric determination of ampicillin, dicluxacillin, flucloxacillin and amoxicillin antibiotic drugs: ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 24: 561-567. (2001).
- Mutabingwa R., Kreiby S., Angelo HR., Fuursted K., Bygbjerg IC: A reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of cotrimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) in children treated for malaria. The Drug Monitoring. 21:609-614. (1999).
- Ocaña J.A., Barragán F.J. Callejón M. Fluorescence and terbium-sensitised luminiscence determination of garenoxacin in human urine and serum. Talanta. 691-697. 2004.

- Pajchel G., Pawlowski K., Tyski S. CE versus LC simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sublactam in pharmaceutical formulations for injections. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 29: 75-81. (2002).
- Peng G. W., Stryd R., Shoji M., Igarashi M., Chiba K., Aoyama H., Aoyama M., Zenki T., Ozawa N. Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 20: 65-73. (1999).
- Quattrochi O., Abelaira S., Laba R. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. 1992 pp 324-327.
- Renew J., Huang Ch. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulphonamide and thrimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1042: 113-121. (2004).
- Salazar Cavazos M.L. Aminoácidos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Estudio de Perfiles en Frutos de diferentes especies de karwinskia. Tesis de maestría. U.A.N.L. Monterrey N.L. 1993.
- Sánchez-Martínez M.L., Aguliar-Caballos M., Gómez-Hens A. Selective Kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 34:1021-1027. (2004).
- Skoog D., Holler F., Nieman T. Principios de Análisis Instrumental 5ta Edición Mc Graw-Hill/Intermanericana de España S.A.U. 2001. Cap 28.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH Topic Q 2 B Validation of Analytical Procedures: Methodology
<http://www.ich.org/guidelines> Quality ICH Topic Q 2A
- The Index Merck. An Encyclpoedia of Chemicals, drugs and biologicals. Merck Co. & Co. Thirteen edition. 2001.
- Tobin C.M., Sunderland J, White L.O., McGowan A. P. A simple, isocratic high performance liquid chromatography assay for linezolid in human serum.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 48:605-608. (2001).

Valera, L., E. Gradelski, E. Huczko, T. Washo, H. Yigit, and J. Fung-Tomc. *In vitro* activity of a novel des-fluoro(6) quinolone, garenoxacin (BMS-284756), against rapidly growing mycobacteria and *Nocardia* isolates. Journal of Antimicrobial and Chemotherapy. 50:140-142. (2002).

Vera-Cabrera L., González E., Choi S., Welsh O. In Vitro Activities of New Antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48:602-604. (2004).

Vera-Cabrera, L., Gomez-Flores A., Escalante-Fuentes W. G, Welsh O. In vitro activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45:3629-3630. (2001).

Vree T.B. Determination of Trimethoprim and Sulfamethoxazole (Co-trimoxazole) in body Fluids of Man by means of High Performance Liquid Chromtography. Journal of Chromtography. 146:103-112. (1978).

Wallace R., Septimus E., Musher D., Berger M., Russell Martin R. Treatment of experimental Nocardiosis in Mice: Comparision of Amikacin and Sulfonamide. The Journal of Infections diseases. 110: (1979).

Welsh O. Salinas M. Rodríguez M. Infectious Diseases. Editado por Hoeprich P. Jordan C. Ronald A. J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1994. Cap.147 pp 1402-1406.

Welsh O. López-López J.R Micetomas con diseminación pulmonar. Med. Cut. I.L.A. 13: 517-523. (1985).

Welsh, O., Saucedo E., Gonzalez J., Ocampo J. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. Journal American Academy of Dermatology. 17: 443-448. (1987).

Xuan D., Turly C., Nightingale C.H., Nicolau D.P. Determination of BMS-284756, a new quinolone in mouse serum by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography B Biomedical Science Applications. 765:37-43. (2001).

Yuan Z., Russlie H, D. Canafax. Sensitive assay for measuring amoxicillin in human plasma and middle ear fluid using solid phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B 674: 93-99. (1995).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Norma Cecilia Cavazos Rocha

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica

Tesis: DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ANTIMICROBIANOS PROPUESTOS EN EL TRATAMIENTO CONTRA ACTINOMICETOMA.

Área de estudio: Química Analítica

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monterrey N.L. el 10 de Diciembre de 1966, hija de Francisco Javier Cavazos García y Norma Rocha . Casada con Héctor Hugo Molina Rodríguez. Hijos: Cecilia, Héctor y Cynthia Marcela.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grados obtenidos: Licenciatura de Químico Clínico Biólogo en 1989, Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica en 1994.

Experiencia Profesional: Personal Profesional no docente de 1989 al 2000 en la Universidad Autónoma de Nuevo León. Maestro Docente de Tiempo Completo en la misma Universidad. Participación en cursos y laboratorios de Química en pregrado y posgrado y en cursos de Educación continua. Asesor de una tesis de posgrado y miembro de comisión de 4 tesis de maestría. Asesor de becarios de pre-grado. Participación en Congresos de Química. 2 publicaciones. Una en revista nacional y otra en internacional. Línea de Investigación: Desarrollo, validación y aplicación de métodos analíticos. Reconocimientos: Tres premios para trabajos de maestría en los que he participado como co-asesor. Maestro con perfil PROMEP. Mejor alumno de Maestría en 1995. Miembro de la Sociedad Química de México desde 1995.

