

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO Y VALIDACION DE METODOS
ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE
GATIFLOXACINA EN LIQUIDO SEMINAL
DE PACIENTES CON INFERTILIDAD

Por

M.C. LUCIA YARELI COLUNGA GONZALEZ

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

Febrero del 2005

M.C. LUCIA YARELI COLUNGA CONZALEZ

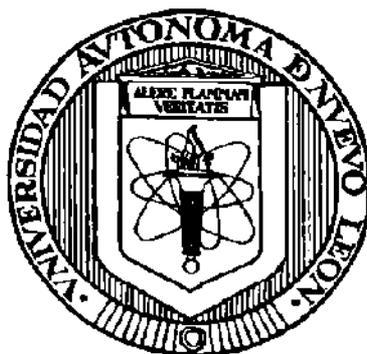
TD
RC889
.C6
2005
c.1



1080126699

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE GATIFLOXACINA EN LÍQUIDO SEMINAL DE
PACIENTES CON INFERTILIDAD**

Por

M.C. LUCÍA YARELI COLUNGA GONZÁLEZ

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

Febrero, 2005

TO

RC 889

. CC

2005

L. 2



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GATIFLOXACINA EN LÍQUIDO SEMINAL DE PACIENTES CON INFERTILIDAD

Aprobación de la Tesis:



DRA. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS
Director de Tesis



DR. PEDRO LUIS LÓPEZ DE ALBA
Co-Director de Tesis



DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Comisión de Tesis



DRA. LEONOR MARIA BLANCO JEREZ
Comisión de Tesis



DR. RICARDO SALAZAR ARANDA
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE GATIFLOXACINA EN LÍQUIDO SEMINAL DE
PACIENTES CON INFERTILIDAD**

Presentado por:

M.C. Lucía Yareli Colunga González

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. María de la Luz Salazar Cavazos.

FIRMA

DIRECTOR



Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos

A mis padres, Lenín Colunga Molina y Esperanza del Carmen González Barrón, cuyo amor, ejemplo y protección han alentado mi ser, para seguir adelante.

Honra a tu padre y a tu madre, para que tus días se alarguen en la tierra que Jehová tu Dios te da.

Éxodo 20:12

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque en Él, todo me es posible.

A mis padres por apoyarme, bendecirme y cuidarme desde el inicio de mi existencia.

A mi esposo por apoyar mi superación personal y compartir metas e ideales.

A mi eterno compañero de posgrado, por hacer de los estudios de maestría y doctorado, un reto más sencillo (¿Dónde es el “posdoc”?).

A mi comisión de tesis, integrada por: Dra. María de la Luz Salazar Cavazos, Dr. Pedro Luis López de Alba, Dra. Noemi Herminia Waksman de Torres, Dra. Leonor María Blanco Jerez y Dr. Ricardo Salazar Aranda, por su tiempo, disposición, paciencia y conocimientos compartidos.

A la Dra. María Guadalupe Gallegos de Lerma, por invitarme a participar en su protocolo, y al personal de laboratorio de Andrología, por “capturar” las muestras.

A la Dra. Noemi Waksman, jefe del departamento de Química Analítica, por su amistad, dirección, apoyo y deferencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico personal.

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

A todas aquellas personas, sin omisión, que me apoyaron técnica, científica, moral y/o espiritualmente durante el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

M.C. Lucía Yareli Colunga González
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Febrero del 2005

Título del estudio: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GATIFLOXACINA EN LÍQUIDO SEMINAL DE PACIENTES CON INFERTILIDAD

Número de páginas: 107

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

Área de estudio: Química Analítica.

Propósito y Método de Estudio

La Gatifloxacina es una 8-metoxifluoroquinolona, que se ha utilizado como tratamiento de infecciones del tracto genital masculino, causadas por *Chlamydia* y *Mycoplasma*, los cuales, se han encontrado presentes en casos de infertilidad donde la infección crónica es asintomática. Por lo cual, resultan de sumo interés, tanto las pruebas para la detección de estos microorganismos, como las pruebas para supervisar los tratamientos empleados para su erradicación.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar métodos analíticos para determinar gatifloxacina en líquido seminal. Las técnicas utilizadas fueron la Espectrofluorimetría, la Espectroscopia UV-VIS y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con detectores de arreglo de diodos (DAD) y de fluorescencia. Para la comparación de los métodos se consideraron dos parámetros: la sensibilidad y la precisión.

El tratamiento de muestra empleado fue la precipitación de proteínas con acetonitrilo. Con el método de Espectrofluorimetría, se encontró un límite de cuantificación 0.2 µg/mL. La precisión del método fue de 1.3 % y el porcentaje de recuperación de 62 % ± 10. La técnica de Espectroscopia UV-VIS no fue lo suficientemente sensible para la determinación del fármaco en la matriz biológica. Y por último, empleando HPLC, los límites de cuantificación para el DAD y de fluorescencia fueron 2.3 y 0.03 µg/mL, respectivamente, la precisión de los métodos fue de 3.4 % para DAD y 2.8 % para fluorescencia. El porcentaje de recuperación fue de 95 % ± 10 para ambos. Las muestras de líquido seminal son estables al menos por 60 días en congelación a -10 °C.

Conclusiones y Contribuciones

El método desarrollado y validado para HPLC con detector de fluorescencia presenta mayor sensibilidad. El método desarrollado y validado por Espectrofluorimetría es más rápido, sencillo y económico. Ambos permiten la cuantificación de gatifloxacina en líquido seminal de pacientes en tratamiento y podrían aplicarse a otras muestras biológicas, si se desarrolla el tratamiento para las mismas.

FIRMA DEL DIRECTOR



Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos.

ÍNDICE

| Capítulo | Página |
|---|----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Quinolonas | 2 |
| 1.2 Fluoroquinolonas | 4 |
| 1.2.1 Relación estructura actividad | 5 |
| 1.2.2 Efectos adversos | 6 |
| 1.3 Gatifloxacina | 8 |
| 1.3.1 Propiedades físicas y químicas | 8 |
| 1.3.2 Relación estructura actividad | 9 |
| 1.3.3 Efectos adversos | 10 |
| 1.3.4 Farmacocinética | 11 |
| 1.3.4.1 Absorción | 11 |
| 1.3.4.2 Distribución | 12 |
| 1.3.4.3 Metabolismo | 12 |
| 1.3.4.4 Eliminación | 13 |
| 1.3.5 Farmacodinamia | 14 |
| 1.3.6 Mecanismo de acción | 14 |
| 1.3.7 Mecanismos de resistencia | 16 |
| 1.3.8 Actividad in vitro | 16 |
| 1.4 <i>Chlamydia</i> y <i>Mycoplasma</i> | 18 |
| 1.5 Características del Líquido Seminal en Condiciones Normales | 19 |
| 1.5.1 Características Morfológicas Normales del Espermatozoide | 21 |
| 1.5.2 Alteraciones del Líquido Seminal en la Infección por <i>Chlamydia</i> y/o <i>Mycoplasma</i> | 23 |
| 1.5.3 Esquemas Generales de Tratamiento para <i>Chlamydia</i> y/o <i>Mycoplasma</i> | 24 |
| 1.6 Antecedentes | 25 |
| 1.6.1 Métodos para Determinar Gatifloxacina | 27 |

| Capítulo | Página |
|---|---------------|
| 1.6.2 Presencia de Aditivos en la Fase Móvil | 30 |
| 1.6.2.1 Reactivos de par iónico de la misma carga que la muestra | 30 |
| 1.6.2.2 Cromatografía de Ion-supresión | 31 |
| 1.7 Justificación | 32 |
| 1.8 Hipótesis | 32 |
| 1.9 Objetivo General | 32 |
| 1.10 Objetivos Específicos | 33 |
| 2 MATERIALES Y MÉTODOS | 34 |
| 2.1 Equipo | 34 |
| 2.2 Material | 35 |
| 2.3 Reactivos | 35 |
| 2.4 Métodos | 36 |
| 2.4.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detectores de Arreglo de Diodos y de Fluorescencia | 36 |
| 2.4.1.1 Condiciones Cromatográficas | 36 |
| 2.4.2 Tratamiento de la Muestra | 28 |
| 2.4.2.1 Fraccionamiento de la Muestra | 38 |
| 2.4.2.2 Preparación de la Muestra | 38 |
| 2.4.2.2.1 Extracción en Fase Sólida | 38 |
| 2.4.2.2.2 Desproteización con acetonitrilo | 39 |
| 2.4.3 Construcción de Curvas de Calibración para HPLC con DAD y Fluorescencia en Líquido Seminal | 40 |
| 2.4.4 Espectroscopia UV-VIS | 40 |
| 2.4.4.1 Selección del Disolvente | 40 |
| 2.4.4.2 Efecto en el Espectro de Absorción debido a la Variación del pH | 41 |
| 2.4.4.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectroscopia UV-VIS | 41 |
| 2.4.5 Espectrofluorimetría | 42 |

| Capítulo | Página |
|-----------------|--|
| 2.4.5.1 | Análisis de Gatifloxacina por Espectrofluorimetría 42 |
| 2.4.5.2 | Efecto en el Espectro de Emisión debido a la Variación de pH 42 |
| 2.4.6 | Validación del Método 43 |
| 2.4.6.1 | Linealidad 43 |
| 2.4.6.2 | Límite de Detección 43 |
| 2.4.6.3 | Límite de Cuantificación 45 |
| 2.4.6.4 | Precisión 46 |
| 2.4.6.5 | Exactitud 47 |
| 2.4.6.6 | Robustez 47 |
| 2.4.6.7 | Estabilidad de la Muestra 51 |
| 2.4.7 | Comparación de los Métodos de Análisis 51 |
| 2.4.8 | Cuantificación de Gatifloxacina en Líquido Seminal de Pacientes 52 |
| 3 | RESULTADOS 53 |
| 3.1 | Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detectores de Arreglo de Diodos y de Fluorescencia 53 |
| 3.2 | Tratamiento de la Muestra 55 |
| 3.2.1 | Fraccionamiento de la Muestra 55 |
| 3.2.2 | Preparación de la Muestra 55 |
| 3.2.2.1 | Extracción en Fase Sólida 56 |
| 3.2.2.2 | Desproteinización con Acetonitrilo 57 |
| 3.3 | Validación de HPLC con DAD y Fluorescencia en Líquido Seminal. 57 |
| 3.3.1 | HPLC con DAD 57 |
| 3.3.1.1 | Cromatograma 57 |
| 3.3.1.2 | Linealidad, Límites de Detección y Cuantificación 58 |
| 3.3.1.3 | Precisión y Porcentajes de Recuperación 59 |
| 3.3.1.4 | Robustez 59 |

| Capítulo | Página |
|---|---------------|
| 3.3.1.5 Selectividad | 61 |
| 3.3.2 HPLC con Detector de Fluorescencia | 61 |
| 3.3.2.1 Cromatograma | 61 |
| 3.3.2.2. Linealidad, Límites de Detección y Cuantificación | 62 |
| 3.3.2.3. Precisión y Porcentajes de Recuperación | 63 |
| 3.3.2.4 Robustez | 63 |
| 3.3.2.5 Selectividad | 65 |
| 3.3.2.6 Estabilidad | 65 |
| 3.4 Espectroscopia UV-VIS | 66 |
| 3.4.1 Selección del Disolvente | 66 |
| 3.4.2 Efecto en el Espectro de Absorción debido a la Variación del pH | 68 |
| 3.4.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectroscopia UV-VIS | 68 |
| 3.4.4 Análisis de Gatifloxacina por Espectroscopia de Derivadas | 69 |
| 3.5 Espectrofluorimetría | 70 |
| 3.5.1 Efecto en el Espectro de Emisión debido a la Variación del pH | 70 |
| 3.5.2 Análisis de Gatifloxacina por Espectrofluorimetría | 71 |
| 3.5.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectrofluorimetría de Derivadas | 72 |
| 3.5.4 Validación | 73 |
| 3.5.4.1 Linealidad, Límites de Detección y Cuantificación | 73 |
| 3.5.4.2 Precisión y Porcentajes de Recuperación | 74 |
| 3.5.4.3 Robustez | 74 |
| 3.5.4.4 Selectividad | 75 |
| 3.6 Comparación de los Métodos de Análisis | 76 |
| 3.7 Cuantificación de Gatifloxacina en Líquido Seminal de Pacientes | 77 |
| 4 DISCUSIÓN | 80 |
| 4.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detectores de Arreglo de Diodos y de Fluorescencia | 80 |

| Capítulo | Página |
|---|---------------|
| 4.1.1 Equilibrar una Columna Fase Reversa con Reactivo de Par Iónico | 81 |
| 4.1.1.1 Lavado de la Columna | 82 |
| 4.1.2 Presencia de Aditivos en la Fase Móvil | 82 |
| 4.2 Tratamiento de la Muestra | 83 |
| 4.2.1 Fraccionamiento de la Muestra | 83 |
| 4.2.2 Preparación de la Muestra | 84 |
| 4.2.2.1 Cartuchos de Extracción en Fase Sólida | 84 |
| 4.2.2.2. Desproteización con Acetonitrilo | 85 |
| 4.3 Validación de HPLC con DAD y Fluorescencia en Líquido Seminal | 87 |
| 4.3.1 HPLC con DAD | 87 |
| 4.3.2 HPLC con Detector de Fluorescencia | 87 |
| 4.3.3 Estabilidad del Analito en la Matriz Biológica | 88 |
| 4.4 Espectroscopia UV-VIS | 88 |
| 4.4.1 Selección del Disolvente | 88 |
| 4.4.2 Efecto en el Espectro de Absorción debido a la Variación del pH | 89 |
| 4.4.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectroscopia UV-VIS | 89 |
| 4.4.4 Análisis de Gatifloxacina por Espectroscopia de Derivadas | 90 |
| 4.5 Espectrofluorimetría | 91 |
| 4.5.1 Efecto en el Espectro de Emisión debido a la Variación del pH | 91 |
| 4.5.2 Análisis de Gatifloxacina por Espectrofluorimetría | 92 |
| 4.5.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectrofluorimetría de Derivadas | 92 |
| 4.5.4 Validación | 93 |
| 4.6 Comparación de los Métodos de Análisis | 94 |
| 4.7 Cuantificación de Gatifloxacina en Líquido Seminal de Pacientes | 94 |

| Capítulo | Página |
|--|---------------|
| 5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 96 |
| 5.1 Conclusiones | 96 |
| 5.2 Perspectivas | 97 |
| REFERENCIAS | 98 |
| APÉNDICE. Estructuras de algunas fluoroquinolonas | 103 |

INDICE DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|--|---------------|
| I | Toxicidad de algunas fluoroquinolonas | 7 |
| II | Valores de referencia para liquido seminal | 23 |
| III | Dosis diaria recomendada por 14 a 21 días para algunos medicamentos | 24 |
| IV | Técnicas para retener compuestos iónicos usando Cromatografía de Líquidos con fase reversa | 31 |
| V | Fases móviles evaluadas durante el desarrollo del método | 37 |
| VI | Diseño de experimentos de <i>Plackett y Burman</i> para HPLC-DAD | 48 |
| VII | Diseño de experimentos de <i>Plackett y Burman</i> para HPLC-fluorescencia | 49 |
| VIII | Diseño de experimentos de <i>Plackett y Burman</i> para Espectroscopia UV-VIS | 49 |
| IX | Diseño de experimentos de <i>Plackett y Burman</i> para Espectrofluorimetría | 50 |
| X | Porcentajes de recuperación de la gatifloxacina con diferente tratamiento de muestra | 56 |
| XI | Ensayo de Robustez, diseño de experimentos de <i>Plackett y Burman</i> para HPLC-DAD | 60 |
| XII | Resultados del ensayo de robustez para HPLC-DAD | 60 |
| XIII | Ensayo de Robustez, diseño de experimentos de <i>Plackett y Burman</i> para HPLC-fluorescencia | 64 |
| XIV | Resultados del ensayo de robustez para HPLC-fluorescencia. | 64 |
| XV | Parámetros de solubilidad y absortividad molar de la gatifloxacina. | 67 |

| Tabla | | Página |
|--------------|--|---------------|
| XVI. | Resultados del Análisis de Robustez para Espectrofluorimetría. Variables λ_{ex} y λ_{em} | 75 |
| XVII. | Resultados del análisis de robustez para Espectrofluorimetría. Variable pH | 75 |
| XVIII. | Límites de cuantificación de gatifloxacina y coeficientes de variación de los métodos | 77 |
| XIX. | Niveles de gatifloxacina en líquido seminal de pacientes en tratamiento por infertilidad | 78 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1. | Estructuras base de las quinolonas a) Núcleo de quinolona b) Núcleo de naftiridona | 2 |
| 2. | Estructura del ácido nalidixico | 3 |
| 3. | Esqueleto base de las fluoroquinolonas | 5 |
| 4. | Estructura de la gatifloxacin | 9 |
| 5. | Relación estructura-actividad de la gatifloxacin | 10 |
| 6. | Metabolitos de la gatifloxacin. | 13 |
| 7. | Cromatograma de gatifloxacin en disolvente con DAD | 54 |
| 8. | Cromatograma de gatifloxacin en disolvente con detector de fluorescencia | 54 |
| 9. | Cromatograma de gatifloxacin en liquido seminal con DAD | 58 |
| 10. | Curva de calibración de gatifloxacin en liquido seminal por HPLC-DAD | 59 |
| 11. | Cromatograma de liquido seminal con DAD | 61 |
| 12. | Cromatograma de gatifloxacin en liquido seminal con detector de fluorescencia | 62 |
| 13. | Curva de calibración de gatifloxacin en liquido seminal por HPLC-fluorescencia | 63 |
| 14. | Cromatograma de liquido seminal con detector de fluorescencia | 65 |
| 15. | Estabilidad de la gatifloxacin en liquido seminal | 66 |
| 16. | Espectros de absorción de la gatifloxacin con los diferentes disolventes | 67 |

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 17. | Espectros de absorción de la gatifloxacin a diferentes pH | 68 |
| 18. | Curva de calibración de gatifloxacin en disolvente por Espectroscopia UV-VIS con arreglo de diodos | 69 |
| 19. | Espectros en 1ª derivada, de líquido seminal de individuos que no están tomando gatifloxacin. | 70 |
| 20. | Espectros de emisión de fluorescencia de gatifloxacin en líquido seminal a diferentes pH | 71 |
| 21. | Espectros de emisión de fluorescencia de gatifloxacin en líquido seminal, a diferentes concentraciones, en pH ácido | 72 |
| 22. | Espectros de emisión de fluorescencia de 1ª derivada de la gatifloxacin en líquido seminal, a diferentes concentraciones, en pH ácido | 73 |
| 23. | Curva de calibración de gatifloxacin en líquido seminal por Espectrofluorimetría | 74 |
| 24. | Espectro de emisión de fluorescencia de líquido seminal | 76 |
| 25. | Cromatogramas por HPLC-DAD, HPLC-fluorescencia, y espectro de emisión de fluorescencia, del líquido seminal del paciente 10 | 79 |

INTRODUCCIÓN

Desde el principio de los tiempos, el hombre ha estado expuesto a un sin número de microorganismos que pueden alterar su triada ecológica, de ahí que la búsqueda de nuevas formulaciones que le permitan erradicar dichos microorganismos resulta de suma importancia para su propio bienestar. A lo largo del tiempo, los agentes patógenos también han luchado por su supervivencia, volviéndose resistentes a dichas formulaciones por lo que la búsqueda de nuevos fármacos, altamente efectivos contra el microorganismo e inoocuos para el ser humano, cierra un círculo interminable entre investigadores y patógenos.

Los agentes antimicrobianos se clasifican en naturales, semisintéticos y sintéticos, según su origen. Los primeros, se obtienen directamente de fuentes biológicas; los segundos, se obtienen inicialmente de fuentes biológicas y posteriormente son modificados por uno o más pasos de síntesis, estos compuestos son en realidad creados sintéticamente. Y por último, los terceros, cuyo origen, como su nombre lo indica, es netamente sintético (Gringauz, 1997).

1.1 Quinolonas

Dentro del grupo de compuestos antimicrobianos sintéticos se encuentran las quinolonas, fármacos con actividad antimicrobiana, que se caracterizan por un anillo N-alquil-3-carboxipirido-4-ona, unido a un segundo anillo aromático con otros sustituyentes.

La estructura de todas las quinolonas de importancia clínica se basa en las modificaciones realizadas sobre un sistema bicíclico que puede corresponder a un núcleo de quinolona (Figura 1a), o bien a un núcleo de naftiridona (Figura 1b). El núcleo base de las quinolonas posee un nitrógeno en la posición 1 del anillo, un sustituyente oxígeno en la posición 4 y un sustituyente flúor en la posición 6, por el cual toman el nombre de fluoroquinolonas; mientras que el núcleo base de naftiridona posee, además, un grupo carboxilo como sustituyente en la posición 3 y un nitrógeno más en la posición 8 del anillo.

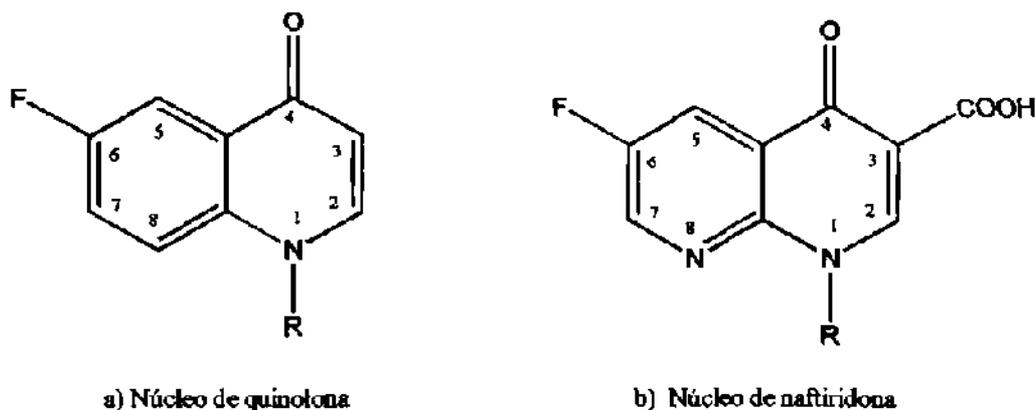


Figura 1. Estructuras base de las quinolonas.

La primera quinolona que salió al mercado en 1965 fue el ácido nalidixico (Figura 2), el cual, es efectivo contra bacterias gramnegativas y se usó como tratamiento oral para infecciones del tracto urinario, pero presenta un espectro clínico limitado. Un dato curioso de este compuesto, es que fue aislado como una impureza durante la síntesis de la cloroquina usada para el tratamiento de la malaria (Foye, *et al.*, 1995; Gringauz, 1997).

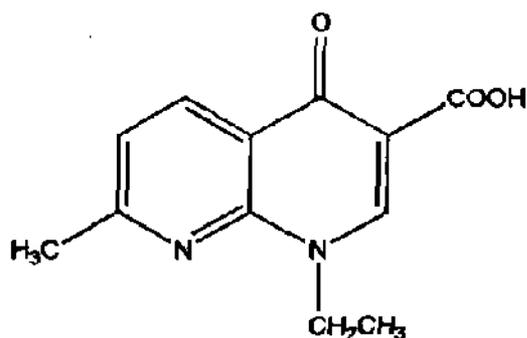


Figura 2. Estructura del ácido nalidixico.

Una década más tarde, surgió la llamada primera generación de quinolonas entre las que encontramos el ácido oxolinico, la cinoxacina y la droxacina. A pesar de considerarse de amplio espectro, quedaron en desuso debido a que se unen ampliamente a proteínas después de su ingestión oral, lo cual les concede una vida media larga, pero no les permite entrar en los compartimentos libres de proteínas como el tracto urinario. Para aumentar su potencia se recomendaba usar dosis altas, lo que trajo consigo efectos colaterales como trastornos digestivos, disfunción visual y erupciones. Estos fármacos se

consideran proconvulsivantes y fotosensibilizadores para individuos susceptibles (Foye, *et al.*, 1995; Gringauz, 1997).

Tiempo después aparece la segunda generación de quinolonas, donde encontramos la rosaxacina, el ácido piromídico y el ácido pipemídico, los cuales siguen restringidos para compartimentos libres de proteínas (Foye, *et al.*, 1995; Gringauz, 1997).

1.2 Fluoroquinolonas

Fue hasta el descubrimiento de las fluoroquinolonas, después de realizar un extenso estudio de relación estructura actividad, que se contó con fármacos que después de su ingestión oral, no se unen fuertemente a proteínas, son de amplio espectro y tienen vida media larga. La principal representante de este grupo es la norfloxacin (1ª generación) descubierta en 1986, con una actividad antimicrobiana 16 a 500 veces más alta que el ácido nalidíxico. Posteriormente, se introdujeron al mercado la ciprofloxacina, la pefloxacina, la fleroxacin, la amifloxacina y la enoxacin, seguidas por la ofloxacina y la lomefloxacina. Más adelante surgió la levofloxacina que es el isómero S-(-) de la ofloxacina, le siguen la temafloxacina, la clinafloxacina, la trovafloxacina y la tosufloxacina. Actualmente la moxifloxacina, gemifloxacina, balofloxacina, grepafloxacina y pazufloxacina son representantes de la última

generación de fluoroquinolonas (Foye, *et al.*, 1995; Gringauz, 1997; Rubinstein, 2001).

Las estructuras de los fármacos antes mencionados se muestran en el APÉNDICE A.

1.2.1 Relación estructura-actividad

Para que este tipo de medicamentos conserve su actividad, el núcleo de nitrógeno de la posición 1 no puede ser reemplazado; sin embargo, pueden unirse a él diferentes sustituyentes; la mayoría de estos compuestos conservan en las posiciones 4 y 6 un oxígeno y un flúor respectivamente, mientras que el resto de las posiciones en el anillo pueden ser ocupadas por diferentes sustituyentes (Rubinstein, 2001), se tiene así, que las modificaciones hechas para crear nuevas fluoroquinolonas parten de la siguiente estructura base (Figura 3).

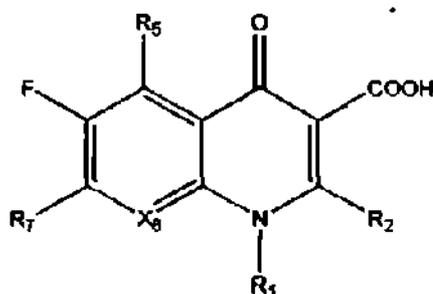


Figura 3. Esqueleto base de las fluoroquinolonas.

Rubinstein en el 2001 reportó la relación entre los sustituyentes y la actividad de las fluoroquinolonas. Cada una de las posiciones en el anillo está relacionada con

actividades específicas, por ejemplo: la posición 1 está relacionada con la potencia y la farmacocinética del fármaco, la posición 2 se relaciona con la unión a la DNA girasa. Los grupos carboxilo y carbonilo de las posiciones 3 y 4 respectivamente, son esenciales para la actividad antibacteriana pues de ellos depende la unión a la DNA girasa y el transporte a la bacteria. La posición 5 controla la potencia y la actividad contra bacterias grampositivas, actividad que se incrementa en este orden (según el sustituyente) $\text{OH} < \text{F} < \text{Cl} < \text{OCH}_3 < \text{NH} < \text{CH}_3$. El flúor en la posición 6 controla la unión a la DNA girasa y la potencia del medicamento; mientras que la posición 7 está involucrada con la potencia, su espectro antibacterial y su farmacocinética, los sustituyentes en C-7 pueden interactuar con enzimas bacterianas y podrían estar involucrados con la permeabilidad hacia la célula bacteriana. La posición 8 está asociada a la farmacocinética y a la actividad contra bacterias anaeróbicas (Rubinstein, 2001). El mecanismo de acción se describe en el apartado 1.3.6.

1.2.2 Efectos adversos

Del mismo modo que se presenta la relación estructura-actividad, también se presenta la relación estructura-efectos adversos, los cuales varían dependiendo de los diferentes sustituyentes unidos al anillo (Figura 3), así pues, la posición 1 controla la interacción con teofilina y la toxicidad genética; para la posición 2 no se conocen efectos relacionados. El oxígeno de la posición 3 y el carboxilo de la posición 4 están involucrados en la unión con metales, quelación, por lo que pueden interactuar con antiácidos, leche, hierro y cationes divalentes como Mg^{++} o Ca^{++} . La posición 5 es

importante por la influencia sobre la fototoxicidad y la toxicidad genética, el efecto adverso aumenta según el sustituyente del modo siguiente $\text{NH}_2 < \text{H} < \text{CH}_3$. No se han reportado efectos en relación al flúor en la posición 6. La posición 7 controla la unión al ácido γ -aminobutírico (GABA) y su actividad en el cerebro, por lo que es responsable de los efectos sobre el sistema nervioso central (SNC); además, está involucrado en la interacción con la teofilina. La posición 8 resulta muy importante pues es la principal mediadora de los efectos de fototoxicidad, dicho efecto aumenta dependiendo del sustituyente en este orden: $\text{OMe} < \text{CH} < \text{N} < \text{CCl} < \text{CF}$ (Rubinstein, 2001). En la TABLA I se enlistan algunas quinolonas y sus efectos adversos.

TABLA I
TOXICIDAD DE ALGUNAS FLUOROQUINOLONAS

| Agente | Año | Efecto adverso |
|-----------------------------|------|--|
| Enoxacxina | 1985 | Severas interacciones del fármaco. |
| Pefloxacina | 1985 | Fototoxicidad, tendinitis, etc. |
| Fleroxacina ^a | 1990 | Fototoxicidad, efectos sobre SNC. |
| Temafloxacina ^a | 1992 | Síndrome hemolítico-urémico (92 casos). |
| Lomefloxacina | 1993 | Fototoxicidad, efectos sobre SNC. |
| BAY-y 3118 ^b | 1993 | Fototoxicidad. |
| Sparfloxacina | 1994 | Fototoxicidad, prolongación del intervalo QTc. |
| Tosufloxacina ^b | 1996 | Trombocitopenia severa y nefritis. |
| Trovafloxacina ^a | 1999 | Hepatotoxicidad (140 casos). |
| Grepafloxacina ^a | 1999 | Eventos cardiovasculares severos. |
| Clinafloxacina ^b | 1999 | Fototoxicidad, hipoglicemia. |

^a Prohibidas en Europa. ^b Desarrollo clínico suspendido.

(Rubinstein, 2001)

1.3 Gatifloxacin

Un integrante más del grupo de fluoroquinolonas de última generación es la gatifloxacin. Fue aprobada para su uso en los Estados Unidos en diciembre de 1999. Es una 8-metoxifluoroquinolona sintética, diseñada para mejorar sus propiedades benéficas y reducir al mínimo las no deseables. Es un racemato con la disponibilidad y actividad antibacteriana virtualmente idéntica para sus dos enantiómeros (R) y (S). Posee un espectro de actividad antimicrobiana más amplio que las fluoroquinolonas más antiguas ya que ejerce una potente actividad contra una amplia variedad de microorganismos grampositivos, gramnegativos, atípicos, micobacterias y microorganismos de difícil crecimiento (Breen, *et al.*, 1999; Bristol-Myers, 2000).

1.3.1 Propiedades físicas y químicas

La fórmula empírica de la gatifloxacin es $C_{19}H_{22}FN_3O_4$ y su peso molecular es de 375.39 g/mol, tiene un coeficiente de partición octanol:agua de 1.14. Se considera un *zwitterion* (pK_{a1} 6.0 y pK_{a2} 9.2), con punto isoelectrico a pH 7.7 (Lutsar, 1998; Naber, *et al.*, 2001). Recibe el nombre químico de ácido (\pm) 1-ciclopropil - 6 - fluor - 1, 4 - dihidro - 8 - metoxi - 7 - (3-metil - 1 - piperazinil) - 4 - oxo - 3 - quinolin carboxílico (Figura 4). Su nombre comercial es *Tequin*.

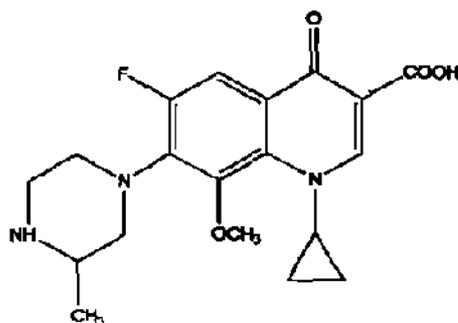


Figura 4. Estructura de la gatifloxacin.

1.3.2 Relación estructura-actividad

La gatifloxacin tiene un grupo ciclopropil en la posición N-1, el cual incrementa su actividad contra gramnegativos y le confiere actividad contra grampositivos. Posee un grupo piperazil en la posición C-7, cuya función es disminuir la unión al GABA, este grupo piperazil tiene un metilo en C-3', mismo que contribuye a la actividad contra grampositivos. El grupo metoxi en la posición C-8 actúa sobre las enzimas bacterianas DNA girasa y topoisomerasa IV, además, disminuye la posibilidad de resistencia bacteriana y elimina el potencial para desarrollar fototoxicidad (Breen, *et al.*, 1999; Bristol-Myers, 2000), (Figura 5).

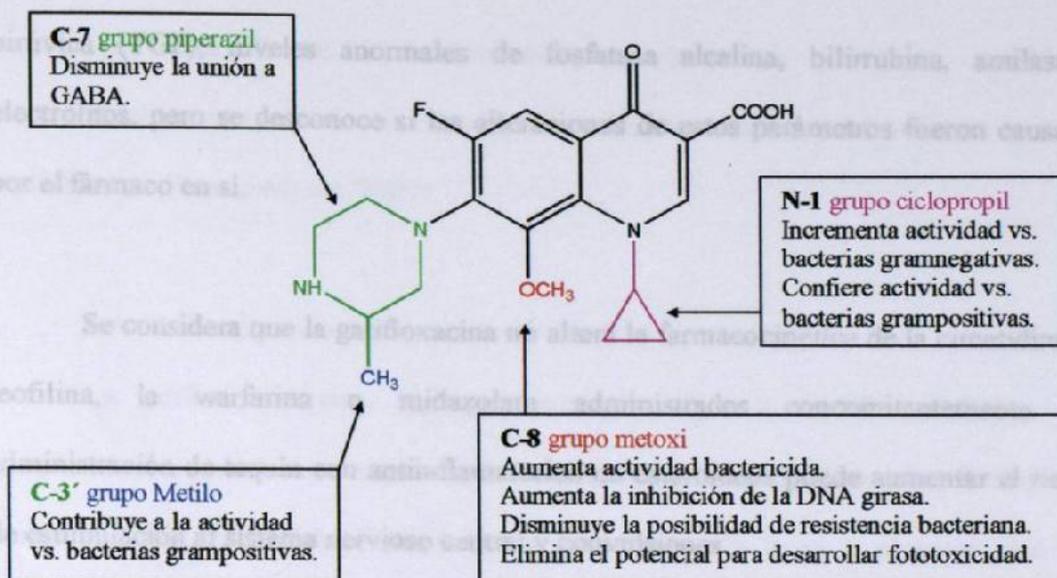


Figura 5. Relación estructura-actividad de la gatifloxacin.

1.3.4 Farmacocinética

1.3.4.1 Absorción:

1.3.3 Efectos adversos

Después de su administración oral, la gatifloxacin se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad absoluta de 96 %, alcanza el pico

La gatifloxacin se considera un medicamento bien tolerado y no se han presentado casos de fototoxicidad, cardiotoxicidad o tendinitis en estudios clínicos de fase II y fase III (Bristol-Myers, 2000).

En un estudio realizado con 5000 pacientes tratados con gatifloxacin, se reportaron los siguientes efectos adversos: náusea en el 8 % de los casos, vaginitis en el 6 %, diarrea en el 4 %, dolor de cabeza en el 3 % y vértigo en el 3 %. Las alteraciones en los parámetros de laboratorio que ocurrieron en < 1% de los casos incluyen: neutropenia, elevación de las transaminasas glutámico oxaloacética (TGO) y glutámico

pirúvica (TGP), niveles anormales de fosfatasa alcalina, bilirrubina, amilasa y electrolitos, pero se desconoce si las alteraciones de estos parámetros fueron causadas por el fármaco en sí.

Se considera que la gatifloxacina no altera la farmacocinética de la cimetidina, la teofilina, la warfarina o midazolam administrados concomitantemente. La administración de tequín con antiinflamatorios no esteroideos puede aumentar el riesgo de estimulación al sistema nervioso central y convulsiones.

1.3.4 Farmacocinética

1.3.4.1 Absorción.

Después de su administración oral, la gatifloxacina se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad absoluta de 96 %, alcanza el pico máximo en plasma 1 ó 2 h después de ingerida la dosis. La ingesta concomitante de leche y alimentos con grasa tienen poco efecto sobre la absorción del medicamento; sin embargo, la administración de sulfato ferroso o de un antiácido a base de aluminio/magnesio 2 a 4 h antes o después de la administración de gatifloxacina reduce significativamente su concentración máxima (C_{max}) y el área bajo la curva (Bristol-Myers, 2000).

Las rutas de administración oral e intravenosa (I.V.) se consideran intercambiables pues su farmacocinética es similar cuando se administran a dosis equivalentes (Bristol-Myers, 2000).

1.3.4.2 Distribución.

La gatifloxacina tiene bajo porcentaje de unión a proteínas (20%) y alta lipofilidad. Se distribuye rápidamente en tejidos y fluidos corporales (incluyendo cerebrospinal); su rápida distribución en los tejidos la lleva a alcanzar mayores concentraciones en éstos que en el mismo plasma. Tienen un volumen de distribución de 1.5 – 2.0 L/kg (Bristol-Myers, 2000).

1.3.4.3 Metabolismo.

Sufre una biotransformación limitada en el humano, se le conocen 4 metabolitos llamados M-1, M-2, M-3 y M-4, tres de ellos se muestran en la Figura 6. M-1 (conjugado glucurónico de la gatifloxacina) y M4 (amina) no han sido detectados en orina. La excreción de gatifloxacina en orina como sus metabolitos M-2 (etilendiamina) y M-3 (metiletildiamina) es de 0.03 % para cada una de ellos. (Nakashima, *et al.*, 1995; Lutsar, *et al.*, 1998; Bristol-Myers, 2000).

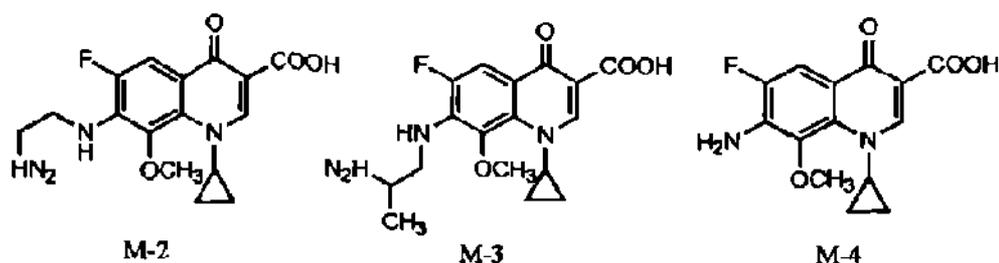


Figura 6. Metabolitos de la gatifloxacin.

Estudios *in vitro* revelan que la gatifloxacin no inhibe al sistema de enzimas del citocromo P450, por tanto, no altera la farmacocinética de fármacos metabolizados por isoenzimas CYP3A, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6. Estudios *in vivo* con animales y humanos demostraron que la gatifloxacin no es un inductor enzimático, por tanto, no puede alterar la eliminación metabólica de ella misma ni de fármacos co-administrados (Breen, *et al.*, 1999; Bristol-Myers, 2000).

1.3.4.4 Eliminación

La gatifloxacin se excreta principalmente por riñón, tiene filtración glomerular y secreción tubular. Más del 70% se recupera sin cambios en orina dentro de las primeras 48 h después de su administración oral o intravenosa, menos del 1% se recupera en forma de sus metabolitos como se mencionó anteriormente, y un 5 % más es excretado por heces. La vida media de la gatifloxacin va de 7 a 14 h independientemente de la dosis o la vía de administración. Los valores promedio de eliminación renal van de 124 a 161 mL/min (Bristol-Myers, 2000).

1.3.5 Farmacodinamia

La farmacodinamia de la gatifloxacina es lineal y tiempo-independiente cuando se administra en un rango de dosis de 200 a 800 mg por más de 14 días. El fármaco alcanza concentraciones plasmáticas estables al tercer día de su administración oral o intravenosa. Después de un régimen de 400 mg diarios alcanza una C_{max} en plasma de 4.2 $\mu\text{g/mL}$ por vía oral y 4.6 $\mu\text{g/mL}$ por vía I.V.

1.3.6 Mecanismo de acción

La actividad antibacteriana de la gatifloxacina proviene de su capacidad de inhibición de las enzimas DNA girasa y Topoisomerasa IV. La primera es esencial en la replicación, transcripción y reparación del DNA bacteriano y la segunda está involucrada en el corte del DNA cromosómico durante la división celular. Cabe mencionar que debido a las diferencias en sus cromosomas, animales y bacterias utilizan diferentes tipos de enzimas para realizar manipulaciones en su DNA, por lo cual, se presume que las funciones animales no resultan alteradas por la presencia del fármaco. Algunos autores consideran la gatifloxacina altamente selectiva para enzimas procarióticas, y lo atribuyen a las diferencias de rotación en la estructura cuaternaria de los dominios de corte-unión de la DNA girasa y la Topoisomerasa II presente en eucariotas (Takei, *et al.*, 1998).

En los procariotas la DNA girasa (codificada por el gen *gyr A*) es una enzima tetramérica formada por dos subunidades A y B que contienen una región α hélice para unir la enzima al DNA, dicha enzima convierte el espiral en una forma superhelicoidal negativa como preparación para la separación del filamento. La otra enzima Topoisomerasa IV también posee dos subunidades (parC y parE), esta enzima separa los círculos ligados que resultan de la duplicación del cromosoma bacteriano. Las quinolonas capturan una o ambas enzimas en el cromosoma bacteriano, creando un complejo medicamento-enzima-DNA con la ruptura de un solo filamento, impidiendo así el paso continuo del DNA a través de la maquinaria de replicación. En esta etapa la acción del medicamento es reversible, sin embargo, en presencia de concentraciones más altas del medicamento, ocurren rupturas de los dos filamentos y la muerte bacteriana sobreviene al no poder sellar los cortes en su material genético (Bristol-Myers, 2000). Algunos autores consideran la DNA girasa como el blanco primario de la gatifloxacina (Fukuda, *et al.*, 1999).

Se considera que todas las quinolonas pueden matar bacterias en división, sin embargo, las nuevas fluoroquinolonas presentan actividad bactericida contra células que no están en división (Gradelski, *et al.*, 2002).

1.3.7 Mecanismos de resistencia

Las mutaciones pueden presentarse a nivel de la DNA girasa o la Topoisomerasa IV. La mutación del gen *gyrA* puede hacer que la subunidad A de la DNA girasa sea inadecuada para la unión del medicamento. Las mutaciones en el α hélice confieren el mayor grado de resistencia; sin embargo, la presencia del grupo metoxi en el C-8 de la estructura de la gatifloxacina, disminuye la capacidad de mutaciones en dicha región para generar la resistencia. Por otro lado, las mutaciones en el gen *gyrB*, también pueden reducir la susceptibilidad al medicamento, sin embargo, este efecto se considera moderado (Bristol-Myers, 2000).

1.3.8 Actividad in vitro

La gatifloxacina muestra actividad contra microorganismos aerobios grampositivos como *Staphylococcus aureus* (cepas susceptibles a metilcilina), *Streptococcus pneumoniae* (cepas susceptibles a penicilina) y *Streptococcus pyogenes*; también contra microorganismos aerobios gramnegativos como *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Proteus mirabilis*; y otros patógenos atípicos como *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae*; involucrados en infecciones del tracto respiratorio inferior y superior, piel, tejidos blandos y tracto genitourinario (Breen, *et al.* 1999; Bristol-Myers, 2000).

En particular, este trabajo se enfoca al uso de la gatifloxacina como tratamiento de infecciones del tracto genital masculino, causadas por *Chlamydia* y *Mycoplasma*, los cuales se han encontrado presentes en casos de infertilidad, donde la infección crónica es asintomática.

La presencia de infecciones, tanto virales como bacteriológicas, pueden afectar de manera relevante la fertilidad del paciente, provocando el deterioro de la espermatogénesis, daño en la función espermática y/o la obstrucción del tracto seminal. El microorganismo de transmisión sexual frecuentemente relacionado con problemas tubarios, es *C. trachomatis* (Keck, 1998).

La prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* fue evaluada en 92 muestras de semen de pacientes asintomáticos, infértiles, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cultivo. Se compararon los resultados con anticuerpos específicos en suero. *U. urealyticum* y *C. trachomatis* se encontraron presentes en un 13 y 11 % de los casos, respectivamente (Levy, 1999).

La elevada frecuencia de detección de estos patógenos en varones infértiles con infecciones asintomáticas, hace pensar que pudieran ser los agentes causales de la infertilidad, y además, podrían estar presentes en un sinnúmero de individuos sin que éstos lo sepan. De ahí que resulten de sumo interés, tanto las pruebas para la detección de estos microorganismos, como las pruebas para monitorear los tratamientos empleados para su erradicación.

1A *Chlamydia* y *Mycoplasma*

Los microorganismos de los géneros *Chlamydia* y *Mycoplasma*, son procariotas que se diferencian de las otras bacterias por su tamaño muy pequeño, la peculiar estructura de su pared celular y en el caso de clamidias, por su parasitismo intracelular obligado. Deben adherirse y multiplicarse en un ambiente protector y las mucosas de los tractos respiratorio y genitourinario proporcionan las condiciones favorables (Finegold, Baron, 1989).

Se conocen sólo dos especies de *Chlamydia*, *C. psittaci* que provoca una neumonía y un cuadro sistémico asociado al contacto con las aves, que se denomina psitacosis u ornitosis, y *C. trachomatis* asociada a cuatro síndromes primarios: tracoma endémico, enfermedad transmitida por vía sexual, conjuntivitis de inclusión y linfogranuloma venéreo (LGV) (Finegold, Baron, 1989).

Las partículas infecciosas de clamidia, llamadas cuerpos elementales (0.3 μm), penetran en la célula por endocitosis, quedan incluidas en un fagosoma e impiden la fusión lisosomal. Los cuerpos elementales dan origen a cuerpos reticulares que se multiplican por fisión binaria 18 a 24 h posinfección, reorganizándose muchos de ellos para dar nuevamente cuerpos elementales infecciosos (Finegold, Baron, 1989).

Chlamydia trachomatis como causa de enfermedad sexual no LGV, puede generar cuadros clínicos semejantes a los provocados por gonococos: uretritis, cervicitis,

bartolinitis, proctitis, salpingitis, epididimitis, etc. Tanto clamidias como gonococos, son causa importante de inflamaciones pélvicas que elevan significativamente el índice de esterilidad. Muchas infecciones por clamidias en personas de ambos sexos son asintomáticas. Se estima que en algunas poblaciones hasta un 22 % de las mujeres y un 7 % de los hombres son portadores asintomáticos (Finegold, Baron, 1989).

Por otro lado, el género *Mycoplasma* pertenece a la clase *Mollicutes*, son microorganismos muy pequeños, pleomórficos y carentes de pared celular, lo que los hace resistentes a las betalactamas y otros fármacos que actúan sobre pared celular. Aunque algunas especies son parte de la flora normal, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* son patógenos importantes del tracto genital humano. Mediante un mecanismo desconocido durante el proceso infeccioso, los micoplasmas lesionan las células de la mucosa y provocan el deterioro de la función ciliar. Se desconocen las circunstancias en que se transforman en patógenos, ya que, un gran número de adultos están colonizados por estas especies y permanecen asintomáticos; por otro lado, también son los causantes de la uretritis no gonocócica y se aíslan con frecuencia de pacientes con inflamación pélvica (Finegold, Baron, 1989).

1.5. Características del Líquido Seminal en Condiciones Normales

El líquido seminal (semen) es una suspensión producida por los testículos, así como por los órganos reproductores masculinos accesorios. Consta básicamente de espermatozoides suspendidos en plasma seminal, el cual, es un medio nutritivo, de

osmolalidad y volumen adecuados para proveer a los espermatozoides de una mayor movilidad (Bernard, 1991).

Los componentes del semen derivan de los siguientes órganos:

Los testículos, de los cuales provienen los espermatozoos, que constituyen apenas un 5 % del volumen total del semen y son el único tipo de células presentes en número apreciable en el semen normal. Los espermatozoides se almacenan en el epidídimo, prácticamente inactivos por las elevadas concentraciones de carnitina y gliceril-fosforilcolina y la disminución del suministro de oxígeno (Bernard, 1991).

Las vesículas seminales aportan el 60 % del volumen del semen, secretan un líquido viscoso, neutro o ligeramente alcalino, a menudo amarillo o incluso muy pigmentado por el alto contenido de flavina, responsable de la fluorescencia del semen a la luz ultravioleta; también tiene un alto contenido de fructosa, principal elemento nutritivo de los espermatozoides; contenidos relativamente altos de potasio y ácido cítrico; y en menor concentración ácido ascórbico, ergotioneína y fosforilcolina. Las vesículas seminales también proporcionan el sustrato que permite la coagulación del semen después de la eyaculación (Bernard, 1991).

La próstata, contribuye con el 20 % del volumen del semen. Su líquido lechoso es ligeramente ácido ($\text{pH} = 6.5$), por su alto contenido de ácido cítrico. También es rica en enzimas proteolíticas, (aminopeptidasa y pepsina, entre otras.) que influyen en la

coagulación y licuefacción del semen; y en fosfatasa ácida, que puede segmentar la fosforilcolina existente en el semen (Bernard, 1991).

El epidídimo, los conductos deferentes, las glándulas bulbouretrales (de *Cowper*) y las glándulas uretrales (de *Littre*), contribuyen con menos del 10 al 15 % del volumen del semen. Sin embargo, se sabe que el epidídimo segrega una serie de proteínas en la luz del túbulo, esenciales para la motilidad de los espermatozoides (Bernard, 1991).

1.5.1. Características Morfológicas Normales del Espermatozoide

Los espermatozoides son células germinales totipotenciales, constituidas de dos partes principales, la cabeza y la cola. Esta última se subdivide en cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal (Arredondo, 1987).

La cabeza, tiene forma aplanada, mide de 4 a 5 μm . Está formada por el núcleo, que contiene el material genético responsable de la transmisión hereditaria de los caracteres del padre; y está cubierta en sus dos terceras partes anteriores por el acrosoma (que proviene del aparato de Golgi) y contiene enzimas hialuronidasa y acrosina (una proteinasa semejante a la tripsina), ambas involucradas en el proceso de fertilización. La hialuronidasa, al ser liberada dispersa las células de la corona radiada del óvulo, y la acrosina permite la penetración de la zona pelúcida del mismo (Arredondo, 1987).

El cuello, es la región que une la cabeza con la pieza media. Aquí se encuentra el centriolo proximal y el filamento axil o axonema, que representa el motor que impulsa al espermatozoide y consta de dos microtúbulos centrales y nueve pares periféricos. Estos microtúbulos comienzan en el cuello y atraviesan las piezas media y principal, terminando en el extremo caudal (Arredondo, 1987).

La pieza media, contiene mitocondrias dispuestas en espiral alrededor de las fibras flagelares. Esta región está rodeada por una porción de citoplasma residual, que se extiende también al cuello y parte posterior de la cabeza (Arredondo, 1987).

La pieza principal, de mayor longitud que la media, se caracteriza por una vaina fibrosa que cubre al filamento axil. Esta vaina está compuesta por fibras organizadas circunferencialmente, que terminan en el límite con la pieza terminal, la cual, está cubierta solo por la membrana celular (Arredondo, 1987).

Los intervalos de referencia considerados normales en un estudio de líquido seminal se observan en la TABLA II.

TABLA II
VALORES DE REFERENCIA PARA LÍQUIDO SEMINAL

| | Valores de referencia | |
|---|-----------------------|---------------|
| | Normal | Anormal |
| <i>Análisis Macroscópico</i> | | |
| Licuefacción completa (min.) | 60 | 120 |
| Color | Blanco perla/amarillo | Rojizo u otro |
| Viscosidad | Normal | Aumentada |
| Volumen (mL) | 1.0 – 6.0 | < 1 ó > 6 |
| <i>Análisis microscópico</i> | | |
| Aglutinación | 0 | > 2 |
| Leucocitos/ 400 HPF | < 5 | > 10 |
| Espermas/mL (10 ⁶) | ≥ 20 | < 10 |
| Espermas/eyaculación (10 ⁶) | ≥ 50 | < 20 |
| <i>Análisis Fisiológico</i> | | |
| Motilidad (%) | ≥ 40 | < 35 |
| <i>Análisis morfológico</i> | | |
| Espermas normales | ≥ 40 | < 35 |
| Cabeza anormal | < 20 | > 30 |
| Formas amorfas | <15 | < 20 |
| <i>Análisis químico</i> | | |
| pH | 7.6 – 8.2 | < 7.6 ó > 8.2 |

(Jeyendran, 2000)

1.5.2 Alteraciones del Líquido Seminal en la infección por *Chlamydia* y/o *Mycoplasma*

Los trastornos andrológicos asociados frecuentemente a infecciones por *Chlamydia* y/o *Mycoplasma* son: azoospermia, oligozoospermia, astenozoospermia,

inmotilidad espermática total, necrozoospermia y teratozoospermia. Cuando la infección produce obstrucción o subobstrucción de la vía seminífera se presenta orquitis, epididimitis, deferentitis y próstato-vesiculitis (Jeyendran, 2000).

1.5.3 Esquemas generales de tratamiento para *Chlamydia* y *Mycoplasma*

Los medicamentos de 1ª elección son las tetraciclinas (doxiciclina y tetraciclina base) seguidos de los macrólidos como la eritromicina, roxitromicina y azitromicina; y como 3ª elección las fluoroquinolonas, grupo del que forma parte la gatifloxacina. Algunos esquemas convencionales de tratamiento se observan en la TABLA III.

TABLA III
DOSIS DIARIA RECOMENDADA POR 14 A 21 DÍAS
PARA ALGUNOS MEDICAMENTOS

| Medicamento | Dosis |
|--------------------|--------------|
| Tetraciclina | 1 – 1.5 g |
| Doxiciclina | 200 – 300 mg |
| Roxitromicina | 300 mg |
| Azitromicina | 500 mg |
| Gatifloxacina | 400 mg |

(Calderón, 1991; Bristol-Myers, 2002).

1.6 ANTECEDENTES

Numerosas técnicas se han desarrollado para el análisis de fluoroquinolonas en diversas matrices incluyendo fluidos biológicos y preparaciones farmacéuticas. Tradicionalmente, el análisis de fluoroquinolonas se ha llevado a cabo por métodos microbiológicos, sin embargo, estas técnicas tienen baja precisión y especificidad, además de que los metabolitos y fármacos co-administrados pueden causar interferencia. Entre las técnicas instrumentales empleadas para el análisis de fluoroquinolonas se encuentran: la cromatografía de líquidos de alta resolución con diferentes detectores, la potenciometría, la conductimetría, la voltamperometría de pulso diferencial, la polarografía de pulso diferencial, la espectrofotometría, la espectrofluorimetría, la espectrofluorimetría de fase sólida y la quimioluminiscencia de inyección de flujo. (Ballesteros, *et al.*, 2002).

De las técnicas antes mencionadas, la cromatografía de líquidos de alta resolución ha resultado una herramienta importante para la determinación de agentes antimicrobianos en fluidos corporales, y las fluoroquinolonas no son la excepción (Carlucci, 1998). Las revisiones señalan la cromatografía de líquidos como la técnica de mayor elección dada su especificidad. En esta técnica predominan las columnas de fase reversa (RP) con adición de modificadores como el fosfato de tetrabutil amonio (TBA) u otra amina apareada para evitar el coqueo del pico; se emplean fases estacionarias con alto grado de recubrimiento de grupos OH, tales como Nucleosil C₁₈. El detector de fluorescencia es el más utilizado por su sensibilidad y especificidad, por otro lado y

aunque de menor sensibilidad, también se emplea el detector UV, principalmente para metabolitos no fluorescentes (Carlucci, 1998).

La electroforesis capilar de zona es una técnica que también se ha empleado en la separación y determinación de quinolonas como enoxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, ácido oxolínico, ácido nalidíxico y ácido pipemídico, en muestras de suero y orina empleando una solución amortiguadora de ácido N-(2-hidroxiethyl)-piperazinil-N'-etansulfónico (HEPES) 100 mM a pH 8.5 con 10 % de acetonitrilo. El medio básico fue seleccionado para optimar la separación de las quinolonas en un intervalo de pH 7.5 a 10 donde predominan las formas aniónicas (Pérez-Ruiz, *et al.*, 1999).

La determinación de ofloxacina en suero y orina por espectrofluorimetría de fase sólida fue reportada por Ballesteros y colaboradores. Trabajaron a pH 3.8 con solución amortiguadora de acetatos y gel *Sephadex SP C-25*. Reportan este método 100 veces más sensible que el método en solución, bajo sus condiciones experimentales (Ballesteros, *et al.*, 2002). Du y colaboradores reportaron la determinación espectrofluorimétrica por formación de complejos de transferencia de carga para norfloxacina, lomefloxacina, pefloxacina y levofloxacina en muestras de orina, con límites de detección semejantes a los reportados para espectrofluorimetría de fase sólida (Du, Lin, 2004). También para la determinación de ofloxacina, levofloxacina, lomefloxacina y ácido pipemídico al formar complejo con el 7, 7, 8, 8-tetracianoquinodimetano (TCNQ), la intensidad de fluorescencia de estos complejos resultó 15 a 90 veces mayor que el fármaco sólo. La técnica se aplicó en presentaciones farmacéuticas, muestras de plasma sanguíneo y orina (Du, Yang, 2004). Para

ciprofloxacina, norfloxacina, pefloxacina y fleroxacina con el mismo reactivo (TCNQ), Du y colaboradores reportaron un aumento en la intensidad de fluorescencia de 21 a 35 (Du, Yao, 2005).

1.6.1 Métodos para Determinar Gatifloxacina

La determinación de gatifloxacina en formulaciones farmacéuticas está reportada por técnicas tan sencillas como una titulación con ácido perclórico 0.1 M (Marona, *et al.*, 2003). La cuantificación de gatifloxacina en plasma sanguíneo, orina y lavado bronqueoalveolar por medio de ensayos microbiológicos, se encuentra reportada con límites de cuantificación de 0.06 mg/L y coeficientes de variación de 7.5 y 8.2 % (Wise, *et al.*, 1999; Honeybourne, *et al.*, 2001). Como se mencionó anteriormente los ensayos microbiológicos se consideran técnicas poco precisas.

Overholser y colaboradores reportaron la determinación de gatifloxacina en suero y orina empleando HPLC con detector de UV, la fase móvil contenía: TBA, dodecil sulfato de sodio (SDS), ácido cítrico y agua:acetonitrilo 50:50. Emplearon una columna *Adsorbosphere HS C18* sílica y una guarda columna de la misma naturaleza química. Reportan valores de sensibilidad por este método de 0.1 µg/mL para suero y 1 µg/mL para orina (Overholser, *et al.*, 2003).

La determinación de gatifloxacina por HPLC con detector de fluorescencia también se caracteriza por el uso de reactivos de par iónico en la fase móvil, Nakashima y colaboradores determinaron gatifloxacina en suero y saliva por ésta técnica con una fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos (pH 2.1), acetonitrilo y 1-octano sulfonato de sodio, con intercambio de columnas, la primera de poliacrilato *Shimpak SPC-PR2* y las segunda *TSKgel ODS-80TM*. Para la determinación en orina y heces la fase móvil contenía ácido fosfórico en lugar de la solución amortiguadora. Y para la determinación de los metabolitos en orina, la fase móvil anterior contenía además tetrahidrofurano, emplearon una columna *TSKgel Octyl-80TS* (Nakashima, *et al.*, 1995). La sensibilidad de este método fue 10 veces mayor que el reportado por HPLC con detector UV.

Valores semejantes de sensibilidad han sido reportados por otros autores para esta misma técnica. Bomer y colaboradores determinaron gatifloxacina en suero y orina por HPLC-fluorescencia con una fase móvil que contenía: TBA, acetonitrilo:agua (17:83) y ácido fosfórico para ajustar el pH a 3.48, emplearon una columna *Nucleosil-100 5C18*. Reportan buena correlación entre el método por HPLC y el ensayo microbiológico (Bomer, *et al.*, 2000). Otra fase móvil reportada para determinar gatifloxacina por esta técnica consta de ácido fosfórico 0.1 M, metanol y trietilamina con pH 3, empleando una columna *Zorbax SB-C18* (Zhu, *et al.*, 2003).

La determinación de gatifloxacina por HPLC-enantioselectiva, con la derivatización de sus enantiómeros R y S con L-valinamida, demostró que tienen farmacocinética similar y no hay interconversión entre ellos (Machida, *et al.*, 1999)

Como se mencionó anteriormente ambos enantiómeros presentan la misma actividad antimicrobiana.

Con una fase móvil de agua:acetonitrilo 57:43, acetato de tetrabutilamonio, dodecil sulfato de sodio y ácido cítrico, Liang y colaboradores reportaron la separación y determinación de gatifloxacina, levofloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina, trovafloxacina y cinoxacina en plasma sanguíneo por HPLC con detectores UV y de fluorescencia. Emplearon una columna *Adsorbosphere HS C18* con un guarda columna de la misma naturaleza química. Estudiaron el efecto del pH y la fuerza iónica (Liang, *et al.*, 2002). La determinación simultánea de gatifloxacina, levofloxacina y moxifloxacina con detector de fluorescencia e intercambio de columnas *LiChrospher 100 RP-18* y *Supelcosil ABZ+Plus*, se llevó a cabo con una fase móvil 1 compuesta por una solución amortiguadora de fosfatos a pH 5.4, ácido ortofosfórico y acetonitrilo, y una fase móvil 2 compuesta por una solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.5, acetonitrilo y bromuro de tetrabutilamonio. El proceso de extracción en línea elimina el tratamiento de muestra y disminuye el tiempo de análisis (Nguyen, *et al.*, 2004).

También la cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS), está reportada para la determinación de gatifloxacina en plasma sanguíneo, con una columna *Astec Cyclobond I 2000* y fase móvil de ácido fórmico 0.1%. La sensibilidad del método fue menor a ng/mL (Vishwanathan, *et al.*, 2001). También está reportado el análisis de impurezas y la determinación de la estructura de la gatifloxacina por HPLC-MS con una fase móvil de ácido acético-acetonitrilo en una columna *Zorbax SB-C* (Zhou, *et al.*, 2004).

Aunque se han reportado métodos espectrofluorimétricos para la determinación de otras fluoroquinolonas, en la revisión bibliográfica solo se encontró un reporte para la determinación de gatifloxacina, en suero y orina, proveniente de una publicación tipo journal en lenguaje chino, del cual solo se cuenta con el *abstract*. La determinación se realizó a pH 3.2 (ajustado con buffer de acetatos). Los límites de detección obtenidos fueron de 88mM. (Lian, *et al.*, 2002).

1.6.2 Presencia de aditivos en la fase móvil

El uso de los reactivos de par iónico se recomienda para los casos en que el analito se encuentra en forma ionizada como es el caso de las fluoroquinolonas, entre ellas la gatifloxacina (Bidlemeier, 1992).

1.6.2.1 Reactivos de par iónico de la misma carga que la muestra.

Es posible controlar la retención de un analito cargado con la adición de un reactivo de par iónico de la misma carga que éste, esto reduce el factor de capacidad (k') de los iones lipofílicos de la muestra y el coeico del pico. Un reactivo de par iónico con carga (+) se adsorbe en la superficie C18 (no polar) dejándola cargada positivamente, lo que reduce tanto el área de superficie disponible, como el volumen de retención de la muestra y optimiza la forma del pico. Como resultado de las interacciones repulsivas iónicas involucradas en la separación, se le refiere como efecto competencia de base (*competing base*), ya que otro compuesto básico es adicionado a la fase móvil e inhibe la adsorción del analito básico en la superficie (Bidlemeier, 1992).

1.6.2.2 Cromatografía de Ion- supresión.

La separación de muestras que se ionizan en disolución acuosa puede optimizarse en una columna fase reversa empleando una disolución amortiguadora. Estos iones (sales) minimizan las interacciones electrostáticas de la muestra iónica con la fase estacionaria, y, como resultado, las muestras son eluidas en zonas más estrechas que si no se usara la sal. La retención en la columna cromatográfica está controlada por la supresión de la ionización de la muestra iónica. El intervalo de pH más comúnmente usado es de 3 a 8 (TABLA IV). El aditivo utilizado para mantener el pH debe permanecer a concentración constante durante el desarrollo del método (Bidlingmeyer, 1992).

TABLA IV

TÉCNICAS PARA RETENER COMPUESTOS IÓNICOS USANDO CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON FASE REVERSA

| Compuesto | pH 2-5 | pH 7-8 | Método |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
| Ácido fuerte pKa < 2 HAs | Iónico As ⁻ | Iónico As ⁻ | Par iónico |
| Ácido débil pKa > 2 HAW | No iónico H:Aw | Iónico Aw ⁻ | Supresión iónica pH 2-5 Par iónico pH 7-8 |
| Base débil pKa < 8 Bw | Iónica H:Bw | No iónico Bw | Par iónico pH 2-5 Supresión iónica pH 7-8 |
| Base Fuerte pKa > 8 Bs | Iónico H:Bs | Iónico H:Bs | Par iónico |

HAs = ácido fuerte
HAW = ácido débil

Bw = base débil
Bs = base fuerte

(Bidlingmeyer, 1992)

1.7 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad no se cuenta con métodos analíticos para la determinación de gatifloxacina en líquido seminal intra y extracelularmente. La posibilidad de llevar a cabo una correlación clínica con los datos obtenidos de la cuantificación de gatifloxacina en tratamientos prolongados a dosis altas, y el poder ajustar un esquema de tratamiento óptimo en dosis y tiempo, justifica la búsqueda de un método rápido, accesible y de bajo costo, que permita supervisar los pacientes con enfermedad crónica común, medir los niveles de excreción del fármaco en líquido seminal y evaluar la eficacia del tratamiento.

1.8 HIPÓTESIS

Es posible que las propiedades fisicoquímicas de la gatifloxacina permitan desarrollar nuevos métodos analíticos, sensibles y robustos, que faciliten su determinación en fluidos biológicos.

1.9 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar métodos analíticos para determinar gatifloxacina intra y extracelularmente en líquido seminal.

1.10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Desarrollar un método analítico para la cuantificación de gatifloxacina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detectores de arreglo de diodos y fluorescencia.**
- 2. Desarrollar la técnica para el tratamiento de muestra.**
- 3. Validar el método desarrollado para la cuantificación de gatifloxacina en líquido seminal por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector de arreglo de diodos y fluorescencia.**
- 4. Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de gatifloxacina en líquido seminal por Espectroscopia Ultravioleta – Visible.**
- 5. Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de gatifloxacina en líquido seminal por Espectrofluorimetría.**
- 6. Comparar los métodos desarrollados y seleccionar el método óptimo para el análisis de gatifloxacina en líquido seminal.**
- 7. Aplicar el o los métodos seleccionados para el análisis de gatifloxacina en líquido seminal de pacientes en tratamiento.**

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipos

- Cromatógrafo de Líquidos Analítico *Waters 2690 Alliance*, con detectores de arreglo de diodos y de fluorescencia
- Espectrofotómetro UV-VIS *Beckman DU 7500* con arreglo de diodos
- Espectrofluorómetro *Luminescence Spectrometer Perkin Elmer LS 45*
- Potenciómetro *Beckman 3500* con electrodo de vidrio para la medición de pH
- Balanza analítica *OHAUS Analytical Plus*
- Centrifuga *Centra CL2 Thermo IFC*
- Microcentrifuga *eppendorf Centrifuge 5415C*
- Baño de agua con sonicador *Branson 3510*
- *Vortex Mini Vortexer VWR Scientific Products*

2.2 Materiales

- Columna *X-Terra RP C18* (D.I. 100 x 2.1 mm, 5 μ m tamaño de partícula)
- Cartuchos de extracción en fase sólida *Oasis HLB* (1cc, 30mg, n-vinilpirrolidona y divinilbenceno)
- Viales de 2mL con tapón de rosca y septum de teflón, para HPLC
- Filtros para HPLC de nylon (13 y 47 mm, de 0.45 μ m)
- Celdas de cuarzo de 1 mL para espectrofotómetro UV-VIS, trayecto óptico 1 cm
- Celdas de cuarzo de 2.7 mL para espectrofluorómetro, trayecto óptico 1 cm
- Matraces de aforación de 10 mL
- Tubos cónicos de 1.5 y 2 mL
- Pipetas automáticas de 10 a 100 μ L y de 100 a 1000 μ L.
- Puntillas
- Guantes para cirujano # 7
- Cubrebocas
- Anteojos de seguridad

2.3 Reactivos

- Gatifloxacina, *Bristol Meyer Squibb*
- Agua, grado HPLC
- Acetonitrilo, *Fisher* grado HPLC

- Metanol, *Fisher* grado HPLC
- Fosfato de tetrabutil amonio, *Baker Analyzed*
- Ácido cítrico, *Sigma-Aldrich*
- Dodecilsulfato de sodio, *Sigma*
- Fosfato diácido de potasio, *Fluka*
- Fosfato monoácido de sodio *Fluka*
- Carbonato de sodio, *Fluka*
- Bicarbonato de sodio, *Fluka*

2.4 MÉTODOS

2.4.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detectores de Arreglo de Diodos y de Fluorescencia

2.4.1.1 Condiciones Cromatográficas.

La separación se llevó a cabo en una columna X-Terra RP 18, de 2.1 x 100 mm y 5 μm de tamaño de partícula. Las fases móviles que se probaron se muestran en la TABLA V. En todos los casos el flujo se mantuvo a 0.4 mL/min.

Para la validación del método se empleó el sistema 7 descrito en la TABLA V con una proporción agua:acetonitrilo 90:10. La columna RP fue embebida con reactivo de par iónico (TBA 10 mM) con un mínimo de 200 volúmenes de fase móvil antes de empezar a trabajar (Quattrocchi, *et al.*, 1992). Se obtuvieron los cromatogramas con el

detector UV-VIS con arreglo de diodos a una longitud de onda de máxima absorbancia (λ_{max}) de 293 nm. El detector de fluorescencia se ajustó a una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 292 nm y una longitud de onda de emisión (λ_{em}) de 480 nm.

A partir de una disolución de gatifloxacina de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acetonitrilo (MeCN), se prepararon estándares para la curva de calibración en disolvente en un intervalo de concentración de 0.2 a 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se analizaron con las condiciones finalmente establecidas.

TABLA V
FASES MÓVILES EVALUADAS DURANTE
EL DESARROLLO DEL MÉTODO

| No. | Sistemas probados isocráticos y en gradiente, a diferentes proporciones |
|-----|---|
| 1 | Metanol:H ₂ O |
| 2 | Acetonitrilo:H ₂ O |
| 3 | Acetonitrilo:Ácido Fórmico 0.1% |
| 4 | H ₂ O con TBA* 0.05% |
| 5 | Acetonitrilo:H ₂ O, TBA* 10 mM, H ₃ PO ₄ pH 3.48 |
| 6 | Acetonitrilo:H ₂ O, TBA* 10 mM, pH 7 |
| 7 | Acetonitrilo:H ₂ O, TBA* 10 mM, Ácido Cítrico 25 mM |
| 8 | Acetonitrilo:H ₂ O, TBA* 10 mM, Ácido Cítrico 25 mM, SDS** 10 ó 15 ó 20 mM. |

* Fosfato de tetrabutil amonio

** Dodecil sulfato de sodio

2.4.2 Tratamiento de la muestra

2.4.2.1 Fraccionamiento de la Muestra.

Las muestras de semen congelado a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron provistas por el laboratorio de Andrología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se homogenizaron por agitación en vortex durante 10 segundos. El líquido seminal se fraccionó en dos partes, la primera para realizar la cuantificación en semen total y la segunda para separar el plasma seminal del sedimento y realizar las cuantificaciones en cada uno de ellos.

Primero se tomaron 500 μL de líquido seminal y se colocaron en un tubo cónico de 1.5 μL ; el volumen restante se centrifugó a 3800 rpm durante 10 minutos, para separar el plasma seminal del paquete celular sin lisar las células. Este procedimiento fue estandarizado por el laboratorio especializado de Andrología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.

2.4.2.2 Preparación de la Muestra.

Para la preparación de las muestras se probaron dos métodos de tratamiento: la extracción en fase sólida (SPE) y la precipitación de proteínas con acetonitrilo.

2.4.2.2.1 Extracción en Fase Sólida. Para la extracción en fase sólida (SPE) se emplearon cartuchos Oasis HLB de fase hidrofílica-hidrofóbica (Vishwanathan, *et al.*; 2001); éstos fueron acondicionados con 1 mL de metanol (MeOH) y posteriormente

equilibrados con 1 mL de agua desionizada. Los cartuchos se cargaron con un volumen de 500 μ L de semen, posteriormente se lavó el cartucho con 1 mL de agua desionizada para eliminar la matriz de la muestra y finalmente con 1 mL de acetonitrilo para eluir el analito. Para eliminar la turbidez de las muestras extraídas, el procedimiento anterior fue aplicado también a muestras previamente desproteinizadas con acetonitrilo (relación 1:1) y centrifugadas a 8000 rpm durante 5 minutos. La elución del cartucho se diluyó 1:2 con fase móvil y se filtró para inyectar al HPLC. También se probó evaporar el solvente de elución y resuspender en fase móvil.

2.4.2.2.2 Desproteinización con Acetonitrilo. Para la precipitación de proteínas con acetonitrilo, a 500 μ L de semen se añadieron 500 μ L de acetonitrilo, se agitaron 10 segundos con vortex y se centrifugaron por 5 minutos a 8000 rpm. Para evitar el enturbiamiento de las muestras, al sobrenadante se le adicionaron 500 μ L más de acetonitrilo, se agitó 10 segundos en vortex y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se diluyó 1:2 en fase móvil, se filtró y se inyectó al HPLC. Este mismo procedimiento se aplicó al plasma seminal y al paquete celular.

Para asegurar la lisis celular posterior a la desproteinización con acetonitrilo, se procesaron 6 sedimentos, tres de ellos fueron sonicados durante 5 minutos a 40 kHz antes de centrifugar, los 3 restantes no se sonicaron. Posteriormente se analizaron al microscopio todos los sedimentos en busca de restos celulares.

2.4.3 Construcción de Curvas de Calibración para HPLC con DAD y Fluorescencia en Líquido Seminal

Para construir las curvas de calibración de gatifloxacina en matriz, se preparó previamente un *pool* de semen de individuos sin tratamiento. Con la disolución de gatifloxacina en acetonitrilo de 10 µg/mL, se prepararon estándares para la curva de calibración en semen en un intervalo de concentraciones de 0.2 a 2.0 µg/mL, se procesaron con la técnica de tratamiento desarrollada, se analizaron con las condiciones cromatográficas establecidas, se encontró la ecuación de la recta (área vs concentración) y se calcularon los límites de detección y cuantificación.

2.4.4 Espectroscopia UV-VIS

2.4.4.1 Selección del Disolvente.

Se prepararon tres disoluciones de gatifloxacina 100 µg/mL en agua destilada, metanol y acetonitrilo, respectivamente, se hicieron diluciones seriadas 1:10 hasta alcanzar concentraciones que correspondieran al rango de absorbancias de 0.2 a 1.2 y se tomaron los espectros de absorción UV-VIS para dichas disoluciones y para los disolventes puros. Se determinaron las longitudes de onda de máxima absorbancia para la gatifloxacina en las cuales no absorbiera el disolvente y se calcularon los coeficientes de absortividad molar (ϵ) para gatifloxacina en cada disolvente.

2.4.4.2 Efecto en el Espectro de Absorción Debido a la Variación del pH.

Para preparar 100 mL de disolución amortiguadora de fosfatos a pH 7 se mezclaron 41.3 mL de disolución de KH_2PO_4 0.066 M con 58.7 mL de Na_2HPO_4 0.066 M. La disolución amortiguadora de carbonatos a pH 10 (100 mL) se preparó mezclando 53.4 mL de disolución de Na_2CO_3 0.1 M con 46.6 mL de NaHCO_3 0.1 M. El pH 3 se ajustó con una disolución amortiguadora de ácido cítrico 10 mM.

Se empleó un estándar de gatifloxacina en agua destilada con el intervalo de absorbancias entre 0.2 y 1.2 para obtener los espectros de absorción a pH 3 (dilución 1:2 con disolución amortiguadora de citratos), a pH 7 (dilución 1:2 con disolución amortiguadora de fosfatos) y a pH de 10 (dilución 1:2 con disolución amortiguadora de carbonatos). Se tomaron los espectros de absorción a los tres diferentes valores de pH.

2.4.4.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectroscopia UV-VIS.

Con la disolución de 100 $\mu\text{g/mL}$ de gatifloxacina en acetonitrilo, se prepararon estándares para la curva de calibración en un intervalo de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ y se leyeron a la λ_{max} de gatifloxacina. Posteriormente, se contaminaron muestras de semen (sin presencia de fármacos), con la disolución de gatifloxacina, y se procesaron con el tratamiento de la muestra para obtener la curva de calibración en matriz. En este caso, la muestra desproteinizada se diluyó 1:2 con disolución amortiguadora de citratos.

2.4.5 Espectrofluorimetría

2.4.5.1 Análisis de Gatifloxacina por Espectrofluorimetría.

A partir de una disolución de gatifloxacina en acetonitrilo (10 µg/mL), se construyeron curvas de calibración con estándares acuosos en un intervalo de concentraciones entre 0.2 y 2 µg/mL y con estas disoluciones se establecieron las λ máximas de excitación y emisión para el analito y el disolvente. Posteriormente, se construyó la curva de calibración en matriz con un intervalo de concentraciones de 0.2 a 2 µg/mL. Al igual que para Espectroscopia UV, las muestras desproteinizadas se diluyeron 1:2 con disolución amortiguadora de citratos.

Para la selección de la λ óptima de emisión, se realizó un barrido en tercera dimensión (*3D scan*) variando la longitud de onda de excitación cada 10 nm desde 250 nm hasta 450 nm, generándose 20 espectros de emisión. Se seleccionaron las condiciones de emisión y excitación que presentaron la mayor respuesta a gatifloxacina sin interferencia de la matriz.

2.4.5.2 Efecto en el Espectro de Emisión Debido a la Variación del pH.

A partir de la disolución de 10 µg/mL de gatifloxacina en acetonitrilo, se contaminaron 3 muestras de semen a una concentración, cuyo rango de emisión de fluorescencia estuviera entre 10 y 100 unidades. Las muestras desproteinizadas se diluyeron 1:2 con disolución amortiguadora de citratos, fosfatos y carbonatos para

obtener los espectros de emisión de la gatifloxacina en la matriz biológica a pH 3, 7 y 10, respectivamente. La preparación de disoluciones amortiguadoras se realizó igual que se mencionó en el punto 2.4.4.2 para espectroscopia UV-VIS.

2.4.6 Validación del Método

La validación de un método según la farmacopea de los Estados Unidos (*USP*) consiste en desarrollar el mismo, asegurándose que sea exacto, específico, reproducible y robusto, dentro de un rango establecido en el cual se determina el analito (Swartz, 1997).

2.4.6.1 Linealidad.

Una vez obtenidos los datos de la curva de calibración, es decir, la respuesta del detector para cada uno de los estándares a las diferentes concentraciones, se capturaron los datos en el programa *Microsoft Excel*® para obtener la regresión lineal y la ecuación de la recta.

2.4.6.2 Limite de Detección.

Se calculó la desviación estándar de los valores de la respuesta del detector “y”, en términos de absorbancia emisión de fluorescencia o área del pico, de la curva de calibración, con la ecuación 1 (Miller, Miller, 1993):

$$(S_{y/x}) = \left[\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 / (n-2) \right]^{1/2} \quad (1)$$

Donde:

- $(S_{y/x})$ = desviación estándar de los valores de "y".
 \hat{y} = "y" estimada, valores de "y" en la ecuación de regresión lineal (Dato obtenido del programa *Microsoft Excel* ®).
 n = número de puntos de la recta (curva de calibración).

Se calculó el valor de "y" en el límite de detección (y'), que corresponde a la respuesta del detector en el límite de detección del método, con la ecuación 2:

$$y' = b + 3 (S_{y/x}) \quad (2)$$

Donde:

- b = intercepto de la ecuación de regresión lineal (Dato obtenido del programa *Microsoft Excel* ®).
 $(S_{y/x})$ = desviación estándar de los valores de "y" calculada con la ecuación 1.

El límite de detección se obtuvo despejando el valor de "x" de la ecuación de la recta, ($y = mx + b$), ecuación 3:

$$x' = (y' - b) / m \quad (3)$$

Donde:

- x' = límite de detección del método.
- y' = respuesta del detector para el límite de detección del método obtenido de la ecuación 2.
- b = intercepto de la ecuación regresión lineal (Dato obtenido del programa *Microsoft Excel*®).
- m = pendiente de la ecuación de regresión lineal (Dato obtenido del programa *Microsoft Excel*®).

2.4.6.3 Límite de Cuantificación.

Se calculó el valor de y'' que corresponde a la respuesta del detector en el límite de cuantificación del método, ecuación 4:

$$y'' = b + 10 (S_{y/x}) \quad (4)$$

Donde:

- y'' = valor de "y" en el límite de cuantificación.
- b = intercepto de la ecuación de regresión lineal (Dato obtenido del programa *Microsoft Excel*®).
- $(S_{y/x})$ = desviación estándar de los valores de "y" calculados con la ecuación 1.

El límite de cuantificación se obtuvo despejando el valor de "x" de la ecuación de la recta, ($y = mx + b$), ecuación 5:

$$x'' = (y'' - b) / m \quad (5)$$

Donde:

- x'' = límite de cuantificación del método.
- y'' = respuesta del detector para el límite de cuantificación del método obtenido de la ecuación 4.
- b = intercepto de la ecuación de regresión lineal (Dato obtenido del programa *Microsoft Excel*®).
- m = pendiente de la ecuación de regresión lineal (Dato obtenido del programa *Microsoft Excel*®).

2.4.6.4 Precisión.

Se preparó un *pool* de muestras de líquido seminal de individuos que no estaban tomando gatifloxacina, posteriormente se le añadió gatifloxacina a una concentración tal, que coincidiera con los valores medios de la curva de calibración obtenida. Se tomaron 5 alícuotas, se procesaron con el tratamiento de muestra desarrollado y se leyeron consecutivamente. Con los datos de las cinco lecturas, se obtuvo el promedio y la desviación estándar con ayuda del programa *Microsoft Excel*®. El coeficiente de variación o desviación estándar relativa se calculó con la ecuación 6:

$$RSD = (x / s) 100 \quad (6)$$

Donde:

- RSD = desviación estándar relativa de los valores leídos.
- x = promedio de los valores de las lecturas
- s = desviación estándar de los valores de las lecturas

2.4.6.5 Exactitud.

De la mezcla preparada para determinar precisión, se tomaron 3 alícuotas más, a las cuales se les añadió gatifloxacina para aumentar en un 25 % la concentración de la misma. Se procesaron de forma individual y se leyeron consecutivamente. El por ciento de recuperación se obtuvo utilizando la ecuación 7:

$$R = [(C_{\text{o-adição}} - C_o)(100)] / [C_{\text{t-adição}} - C_i] \quad (7)$$

Donde:

- R = por ciento de recuperación.
- $C_{\text{o-adição}}$ = promedio de las concentraciones obtenidas de las muestras con 25 % más de gatifloxacina.
- C_o = promedio de las concentraciones obtenidas de las muestras para determinar precisión.
- $C_{\text{t-adição}}$ = concentración teórica de las muestras con 25 % más de gatifloxacina.
- C_i = concentración teórica de las muestras para determinar precisión.

2.4.6.6 Robustez.

Se realizó un diseño de experimentos de *Plackett y Burman*: para cada variable se escogió un nivel bajo y uno alto, representados por letras minúscula y mayúscula, respectivamente (Quattrocchi, *et al.*, 1992; (Montgomery, 2004). Las variables para el diseño con HPLC-DAD (TABLA VI) fueron el volumen de inyección, la proporción del eluente, el flujo y la λ_{max} . Para el método de HPLC con detector de fluorescencia

(TABLA VII) se evaluaron también las λ_{ex} y λ_{em} . En ambos casos el parámetro a evaluar fue el tiempo de retención (t_R) del analito.

Las variables propuestas para Espectroscopias UV-VIS (TABLA VIII) y de fluorescencia (TABLA IX) fueron el pH y la λ_{max} o λ_{ex} y λ_{em} , respectivamente. Para ambos casos, el parámetro a evaluar fue la respuesta del analito.

TABLA VI
DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE *PLACKET*
***Y BURMAN* PARA HPLC-DAD**

| Factor/Ensayo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Vol. inyección | A | A | A | A | a | a | a | a |
| Eluente | B | B | b | b | B | B | b | b |
| Flujo | C | c | C | c | C | c | C | c |
| λ_{max} | D | D | d | d | d | d | D | D |
| Resultado (t_R) | s | t | u | v | w | x | y | z |

TABLA VII
DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE *PLACKET Y BURMAN* PARA HPLC-FLUORESCENCIA

| Factor/Ensayo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Vol. inyección | A | A | A | A | a | a | a | a |
| Eluente | B | B | b | b | B | B | b | b |
| Flujo | C | c | C | c | C | c | C | c |
| λ_{ex} | D | D | d | d | d | d | D | D |
| λ_{em} | E | e | E | e | e | E | e | E |
| Resultado (t_R) | s | t | u | v | w | x | y | z |

TABLA VIII
DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE *PLACKET Y BURMAN* PARA ESPECTROSCOPIA UV-VIS

| Factor/Ensayo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| pH | A | A | A | A | a | a | a | a |
| λ_{max} | B | B | b | b | B | B | b | b |
| Resultado (Absorbancia) | s | t | u | v | w | x | y | z |

TABLA IX
DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE PLACKET Y BURMAN
PARA ESPECTROFLUORIMETRÍA

| Factor/Ensayo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| pH | A | A | A | A | a | a | a | a |
| λ_{ex} | B | B | b | b | B | B | b | b |
| λ_{em} | C | c | C | c | C | c | C | c |
| Resultado (Intensidad de fluorescencia) | s | t | u | v | w | x | y | z |

Cálculo de la diferencia para cada factor

$$A-a \quad V_A = 1/4(s+t+u+v) - 1/4(w+x+y+z)$$

$$B-b \quad V_B = 1/4(s+t+w+x) - 1/4(u+v+y+z)$$

$$C-c \quad V_C = 1/4(s+u+w+y) - 1/4(t+v+x+z)$$

$$D-d \quad V_D = 1/4(s+t+y+z) - 1/4(u+v+w+x)$$

$$E-e \quad V_E = 1/4(s+u+x+z) - 1/4(t+v+w+y)$$

Si $|V| > s(2)^{1/2}$ la diferencia es significativa

Donde:

$|V|$ = valor absoluto del cálculo de la diferencia de los promedios alto y bajo para cada uno de los factores (A-E).

s = desviación estándar derivada del experimento de precisión.

2.4.6.7 Estabilidad de la muestra.

Se guardaron en congelación, alícuotas de líquido seminal a las que se le adicionó gatifloxacina a una concentración intermedia de la curva de calibración y periódicamente se descongelaron para analizarlas a los 5, 12, 24, 48 y 60 días. Se construyeron gráficas control teniendo como valores límites los datos de la desviación estándar obtenidos del análisis de precisión (Christian, 1994; FDA, 2001).

$$\bar{x} \pm 2s$$

Donde:

“ \bar{x} ” y “ s ” = son los valores de la ecuación 6.

2.4.7 Comparación de los Métodos de Análisis

Los parámetros de comparación entre los diferentes métodos analíticos desarrollados para la cuantificación de gatifloxacina en líquido seminal, fueron la sensibilidad en función del límite de cuantificación (Ec. 5) y la precisión (Ec. 6).

2.4.8 Cuantificación de Gatifloxacin en Líquido Seminal de Pacientes

La cuantificación de gatifloxacin intra y extracelularmente en líquido seminal de pacientes, se llevó a cabo siguiendo el tratamiento de muestra desarrollado y empleando los métodos seleccionados.

Las muestras de semen congeladas fueron provistas por el Laboratorio Especializado de Andrología del Departamento de Patología de la misma facultad, donde previamente se les practicó un estudio seminológico y una bacterioscopia. Posteriormente se analizaron por medio de HPLC con detector de fluorescencia y por espectrofluorimetría. Los resultados fueron comparados haciendo un análisis de varianza de un factor ($\alpha = 0.05$) (Montgomery, 2004) con el programa *Microsoft Excel*®.

RESULTADOS

3.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detectores de Arreglo de Diodos y de Fluorescencia

De los sistemas de elución probados, las mejores condiciones cromatográficas se obtuvieron con la fase móvil isocrática H₂O:MeCN 90:10, adicionada con TBA 10 mM y ácido cítrico 25 mM, con flujo de 0.4 mL/min. El detector UV-VIS con arreglo de diodos a una λ_{max} de 293 nm y el detector de fluorescencia con una λ_{ex} de 292 nm y una λ_{em} de 480 nm. Los cromatogramas obtenidos de la inyección de gatifloxacina en disolvente se muestran en las Figuras 7 y 8. Se determinó el tiempo de retención de la gatifloxacina bajo estas condiciones cromatográficas, con el detector de arreglo de diodos fue de 2.5 minutos y con el detector de fluorescencia fue de 2.3 minutos.

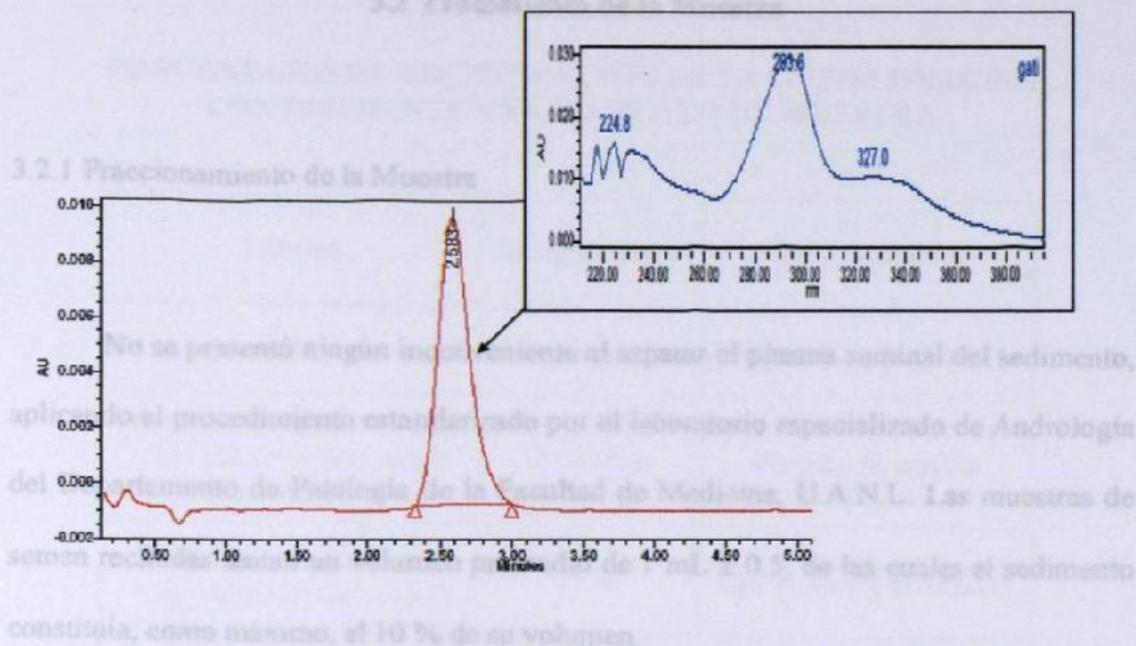


Figura 7. Cromatograma de gatifloxacin en disolvente con DAD.

Columna X-Terra RP 18, 5 μm (2.1 x 100 mm). Fase móvil isocrática $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ 90 :10, TBA 10 mM y ácido cítrico 25 mM. Flujo de 0.4 mL/min. λ_{max} 293 nm. t_{R} del analito 2.6 min. En el recuadro superior derecho se observa el espectro de absorción de la gatifloxacin.

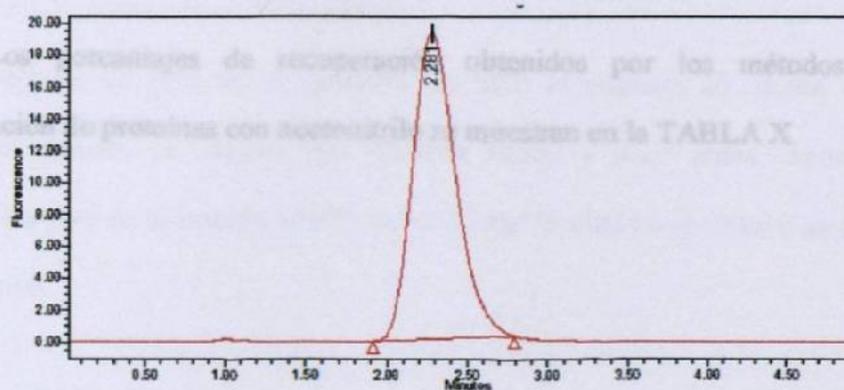


Figura 8. Cromatograma de gatifloxacin en disolvente con detector de

fluorescencia. Columna X-Terra RP 18, 5 μm (2.1 x 100 mm). Fase móvil isocrática $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ 90:10, TBA 10 mM y ácido cítrico 25 mM. Flujo de 0.4 mL/min. λ_{ex} 292 nm. λ_{em} 480 nm. t_{R} del analito 2.3 min.

3.2 Tratamiento de la Muestra

3.2.1 Fraccionamiento de la Muestra

No se presentó ningún inconveniente al separar el plasma seminal del sedimento, aplicando el procedimiento estandarizado por el laboratorio especializado de Andrología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. Las muestras de semen recibidas tenían un volumen promedio de $1 \text{ mL} \pm 0.5$, de las cuales el sedimento constituía, como máximo, el 10 % de su volumen.

3.2.2 Preparación de la Muestra

Los porcentajes de recuperación obtenidos por los métodos de SPE y precipitación de proteínas con acetonitrilo se muestran en la TABLA X.

TABLA X

**PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE LA GATIFLOXACINA
CON DIFERENTE TRATAMIENTO DE MUESTRA**

| Técnica | Recuperación | Observaciones |
|--|---------------------|---------------------------------------|
| SPE | No realizada | No viable para HPLC |
| Desproteínezación + SPE a) diluir en fase móvil b) evaporar con N ₂ | 21-34 % | Pérdida de analito |
| Desproteínezación única a) diluir en fase móvil | 95 % | Las muestras precipitan |
| 1ª y 2ª Desproteínezación a) diluir en fase móvil | 95 % | No se pierde analito No precipitan |

3.2.2.1 Extracción en Fase Sólida.

Después de inyectar al cartucho de SPE la muestra de semen cruda sin un tratamiento previo, se obtiene una muestra turbia y muy densa, características no compatibles para su inyección al HPLC, razón por la cual no se obtuvo su porcentaje de recuperación.

Al inyectar el cartucho de SPE con una muestra de semen previamente desproteínezada, se encontraron porcentajes de recuperación del 34 %. Para las muestras que al salir del cartucho fueron evaporadas con N₂ y posteriormente resuspendidas en fase móvil, se calcularon porcentajes de recuperación del 21 %.

3.2.2.2 Desproteinización con Acetonitrilo.

Los porcentajes de recuperación obtenidos de las muestras de semen desproteinizadas con un volumen igual de acetonitrilo fueron de 95 %. Estas muestras precipitaban dentro de los viales a temperatura ambiente y en refrigeración.

Las muestras de semen desproteinizadas con un segundo volumen de acetonitrilo no precipitaron en los viales. Los porcentajes de recuperación obtenidos por este método fueron de 95 %. Este fue el tratamiento de muestra de elección.

Ninguno de los sedimentos observados al microscopio, sonicados y no sonicados presentó restos celulares.

3.3 Validación de HPLC con DAD y Fluorescencia en Líquido Seminal

3.3.1 HPLC con DAD

3.3.1.1 Cromatograma.

El cromatograma de gatifloxacina en líquido seminal, obtenido con el detector de arreglo de diodos a 293 nm, así como el espectro de absorción de la gatifloxacina se muestran en la Figura 9. La gatifloxacina se observa a un tiempo de retención de 2.5 minutos. Las señales con tiempo de retención menor a 1.9 minutos corresponden al líquido seminal.

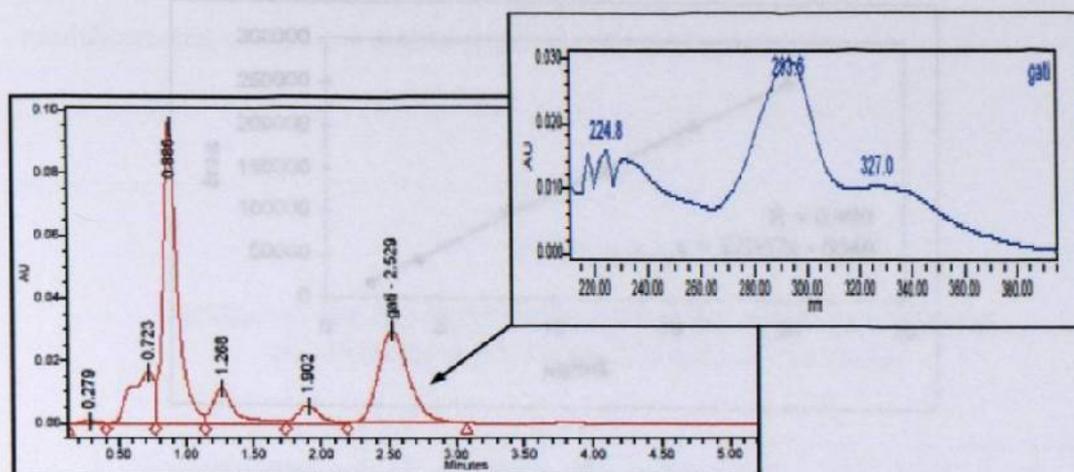


Figura 9. Cromatograma de gatifloxacina en líquido seminal con DAD. Columna X-Terra RP 18, 5 μm (2.1 x 100 mm). Fase móvil isocrática $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ 90:10, TBA 10 mM y ácido cítrico 25 mM. Flujo de 0.4 mL/min. λ_{max} 293 nm. t_{R} del analito 2.5 min. En el recuadro superior derecho se observa el espectro de absorción de la gatifloxacina.

3.3.1.3 Precisión y Porcentajes de Recuperación.

El método tiene un coeficiente de variación del 3.4 % para los valores intermedios de la curva de calibración con un porcentaje de recuperación promedio de 92. El porcentaje de recuperación es del 91.4-110.

3.3.1.2 Linealidad, Límites de Detección y Cuantificación.

El método desarrollado por HPLC con DAD para la determinación de gatifloxacina en líquido seminal presentó un coeficiente de regresión lineal de 0.999, con límites de detección y cuantificación de 0.7 y 2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Una curva de calibración y la ecuación de la recta se muestran en la Figura 10.

Los resultados obtenidos en el análisis de muestras se muestran en el diseño de experimentos de Plackett y Burman se muestran en la TABLA XI. El parámetro a evaluar fue el t_{R} del analito y las variables estudiadas fueron: el volumen de inyección, la proporción del disolvente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (manteniéndose constantes las concentraciones de TBA y ácido cítrico), el flujo y la λ_{max} . El análisis de los datos obtenidos demostró

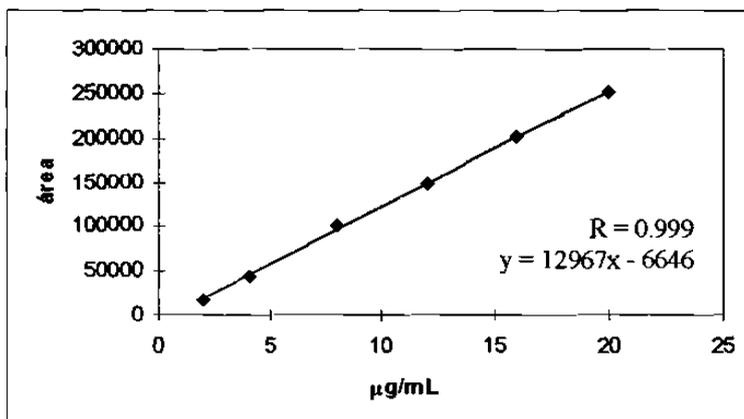


Figura 10. Curva de calibración de gatifloxacina en líquido seminal por HPLC-DAD.

3.3.1.3 Precisión y Porcentajes de Recuperación.

El método tiene un coeficiente de variación del 3.4 % para los valores intermedios de la curva de calibración, con una desviación estándar de 0.2. El porcentaje de recuperación es del 95 % \pm 10.

3.3.1.4 Robustez.

Los resultados obtenidos del análisis de robustez mediante un diseño de experimentos de *Plackett y Burman* se muestran en la TABLA XI. El parámetro a evaluar fue el t_R del analito y las variables evaluadas fueron: el volumen de inyección, la proporción del eluente H₂O:MeCN (permanecieron constantes las concentraciones de TBA y ácido cítrico), el flujo y la λ_{max} . El análisis de los datos obtenidos demostró

(TABLA XII) que la proporción del eluente y el flujo son dos variables cuyas pequeñas modificaciones afectan las determinaciones por este método.

TABLA XI
ENSAYO DE ROBUSTEZ, DISEÑO DE EXPERIMENTOS
DE PLACKET Y BURMAN PARA HPLC-DAD

| Experimento | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------------------|------|------|-------|-------|------|------|-------|-------|
| Inyección (μL) | 8 | 8 | 8 | 8 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Eluente | 95:5 | 95:5 | 85:15 | 85:15 | 95:5 | 95:5 | 85:15 | 85:15 |
| Flujo (mL/min) | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.3 |
| λ_{max} | 296 | 296 | 290 | 290 | 290 | 290 | 296 | 296 |
| t_R (minutos) | 4.9 | 8 | 1 | 1.5 | 4.8 | 8.1 | 1 | 1.5 |

TABLA XII
RESULTADOS DEL ENSAYO DE ROBUSTEZ PARA HPLC-DAD

| Factor | $ V $ | Afectan |
|-----------------------------|-------|---------|
| Inyección (μL) | 0 | No |
| Eluente | 20.8 | Sí |
| Flujo (mL/min) | 7.4 | Sí |
| λ_{max} | 0 | No |

Si $|V| > s(2)^{1/2}$, la diferencia es significativa

Figura 3.3.1.5 Selectividad. Se analizaron 30 muestras de individuos que no tomaron gatifloxacina. En ninguna de las muestras se detectó señal al tiempo de retención del analito (Figura 11). Ninguno de los cromatogramas presentó señales a $t_R > 1.8$ min.

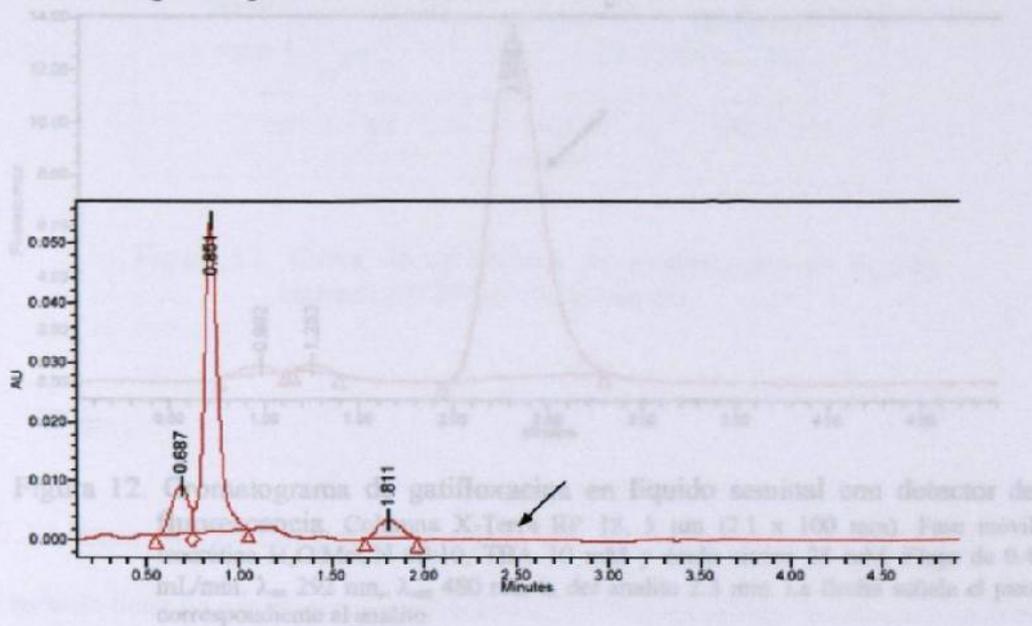


Figura 11. Cromatograma de líquido seminal con DAD. Columna X-Terra RP 18, 5 μm (2.1 x 100 mm). Fase móvil isocrática $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ 90:10, TBA 10 mM y ácido cítrico 25 mM. Flujo de 0.4 mL/min. λ_{max} 293 nm. La flecha indica el t_R para la señal analítica de la gatifloxacina.

3.3.2.2 Linealidad, Límites de Detección y Cuantificación

El método por HPLC con detector de fluorescencia para la determinación de gatifloxacina en líquido seminal presentó un coeficiente de regresión lineal de 0.999, con límites de detección y cuantificación de 0.01 y 0.03 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La curva de calibración y la ecuación de la recta se muestran en la Figura 13.

3.3.2.1 Cromatograma.

El cromatograma de gatifloxacina en líquido seminal con detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 292 nm y de emisión de 480 nm se muestra en la

figura 12. La gatifloxacina presentó un tiempo de retención de 2.3 minutos. Las señales correspondientes al líquido seminal tienen un tiempo de retención de 0.9 y 1.2 minutos.

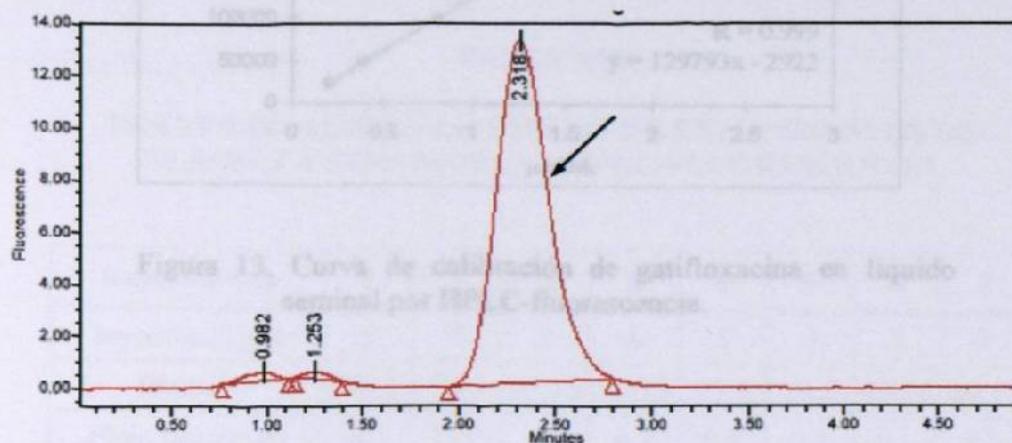


Figura 12. Cromatograma de gatifloxacina en líquido seminal con detector de fluorescencia. Columna X-Terra RP 18, 5 μm (2.1 x 100 mm). Fase móvil isocrática $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ 90:10, TBA 10 mM y ácido cítrico 25 mM. Flujo de 0.4 mL/min. λ_{ex} 292 nm, λ_{em} 480 nm. t_{R} del analito 2.3 min. La flecha señala el pico correspondiente al analito.

3.3.2.2. Linealidad, Límites de Detección y Cuantificación.

El método por HPLC con detector de fluorescencia para la determinación de gatifloxacina en líquido seminal presenta un coeficiente de regresión lineal de 0.999, con límites de detección y cuantificación de 0.01 y 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. La curva de calibración y la ecuación de la recta se muestran en la Figura 13.

El análisis de los datos obtenidos se muestra en la TABLA XIV que la proporción del eluyente y

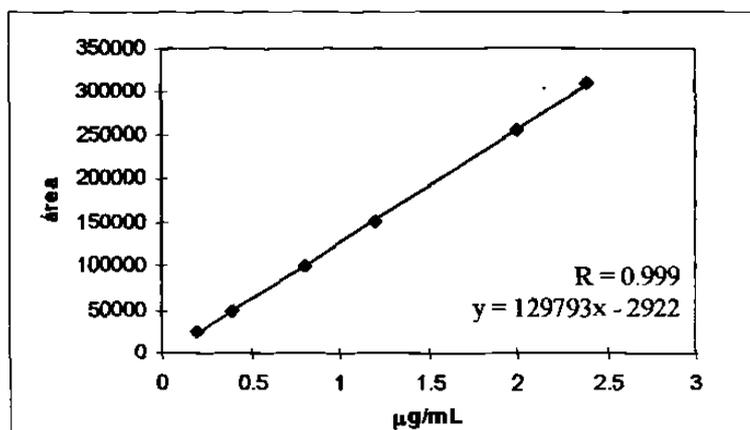


Figura 13. Curva de calibración de gatifloxacina en líquido seminal por HPLC-fluorescencia.

3.3.2.3 Precisión y Porcentajes de Recuperación.

El método tiene un coeficiente de variación de 2.8 % para el valor intermedio de la curva de calibración, con una desviación estándar de 0.02. El porcentaje de recuperación es del 95 % \pm 10.

3.3.2.4 Robustez.

El resultado obtenido del análisis de robustez con un diseño de experimentos de *Plackett* y *Burman* se muestra en la TABLA XIII. El parámetro a evaluar fue el tiempo de retención del analito y las variables evaluadas fueron: el volumen de inyección, la proporción del eluente H₂O:MeCN (TBA y ácido cítrico permanecieron constantes), la velocidad de flujo, la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión. El análisis de los datos obtenidos demostró TABLA XIV que la proporción del eluente y

la velocidad de flujo son dos variables cuyas pequeñas modificaciones afectan las determinaciones por este método.

TABLA XIII

**ENSAYO DE ROBUSTEZ, DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE
PLACKET Y BURMAN PARA HPLC-FLUORESCENCIA**

| Experimento | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------------------|------|------|-------|-------|------|------|-------|-------|
| Inyección (μL) | 8 | 8 | 8 | 8 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Eluente | 95:5 | 95:5 | 85:15 | 85:15 | 95:5 | 95:5 | 85:15 | 85:15 |
| Flujo (mL/min) | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.3 |
| λ_{ex} | 295 | 295 | 289 | 289 | 289 | 289 | 295 | 295 |
| λ_{em} | 483 | 477 | 483 | 477 | 477 | 483 | 477 | 483 |
| t_{R} (minutos) | 4.9 | 8 | 1 | 1.5 | 4.8 | 8.1 | 1 | 1.5 |

TABLA XIV

**RESULTADOS DEL ENSAYO DE ROBUSTEZ
PARA HPLC-FLUORESCENCIA**

| Factor | V | Afectan |
|-----------------------------|------|---------|
| Inyección (μL) | 0 | No |
| Eluente | 20.8 | Sí |
| Flujo (mL/min) | 7.4 | Sí |
| λ_{ex} | 0 | No |
| λ_{em} | 0.2 | No |

Si $|V| > s(2)^{1/2}$, la diferencia es significativa

3.3.2.5 Selectividad.

De las 30 muestras analizadas, correspondientes a individuos que no estaban en tratamiento con gatifloxacina, ninguna presentó interferencia en el tiempo de retención donde se esperaba la señal del analito (Figura 14). Ninguno de los cromatogramas presentó señales a $t_R > 1.3$ min.

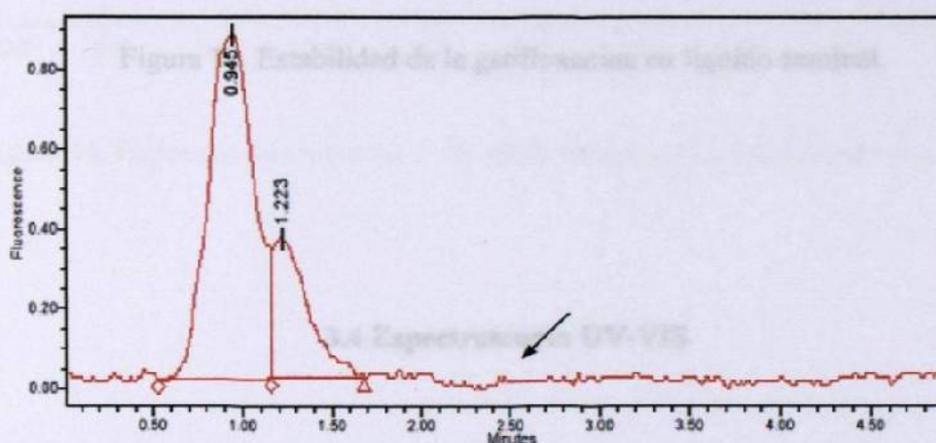


Figura 14. Cromatograma de líquido seminal con detector de fluorescencia. Columna X-Terra RP 18, 5 μm (2.1 \times 100 mm). Fase móvil isocrática $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ 90:10, TBA 10 mM y ácido cítrico 25 mM. Flujo de 0.4 mL/min. λ_{exc} 292 nm, λ_{em} 480 nm. La flecha indica el t_R para la señal del analito.

3.3.2.6 Estabilidad.

La gatifloxacina en muestras de semen congeladas es estable un mínimo de 60 días (Figura 15).

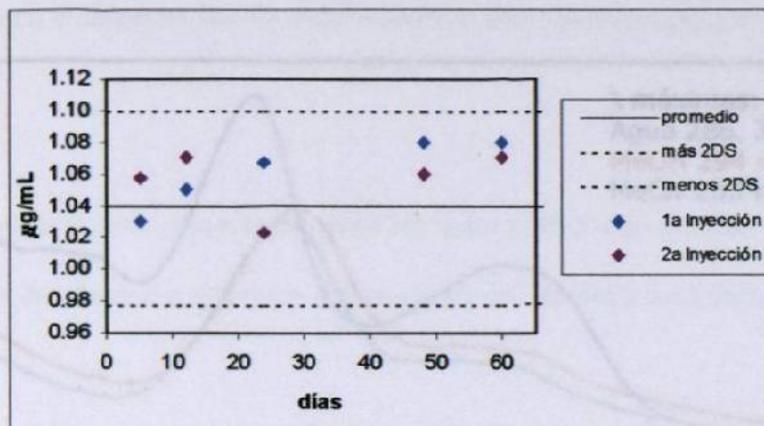


Figura 15. Estabilidad de la gatifloxacina en líquido seminal.

Figura 16. Espectros de absorción de la gatifloxacina con los diferentes disolventes.

3.4 Espectroscopia UV-VIS

3.4.1 Selección del Disolvente

TABLA XV

PARÁMETROS DE SOLUBILIDAD Y ABSORTIVIDAD MOLAR DE LA GATIFLOXACINA

La Figura 16 muestra los espectros de absorción de la gatifloxacina con los diferentes disolventes. La TABLA XV muestra las absorptividades molares (ϵ) determinadas y las λ_{\max} para la gatifloxacina en los disolventes probados. Con el metanol se obtuvo la mayor absorptividad molar para la gatifloxacina, mientras que, con el acetonitrilo se obtuvo la mayor solubilidad.

3.4.2 Efecto en el Espectro de Absorción Debido a la Variación del pH

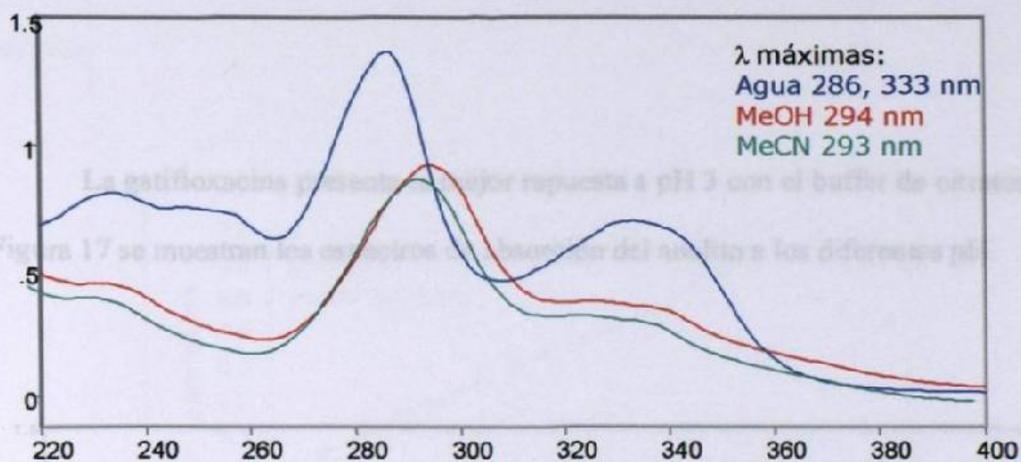


Figura 16. Espectros de absorción de la gatifloxacina con los diferentes disolventes.



TABLA XV

PARÁMETROS DE SOLUBILIDAD Y ABSORTIVIDAD MOLAR DE LA GATIFLOXACINA

| Disolvente | ϵ | Solubilidad | λ máxima |
|--------------|------------|-------------|------------------|
| Agua | 25500 | + | 286 |
| Metanol | 31500 | ++ | 294 |
| Acetonitrilo | 16875 | +++ | 293 |

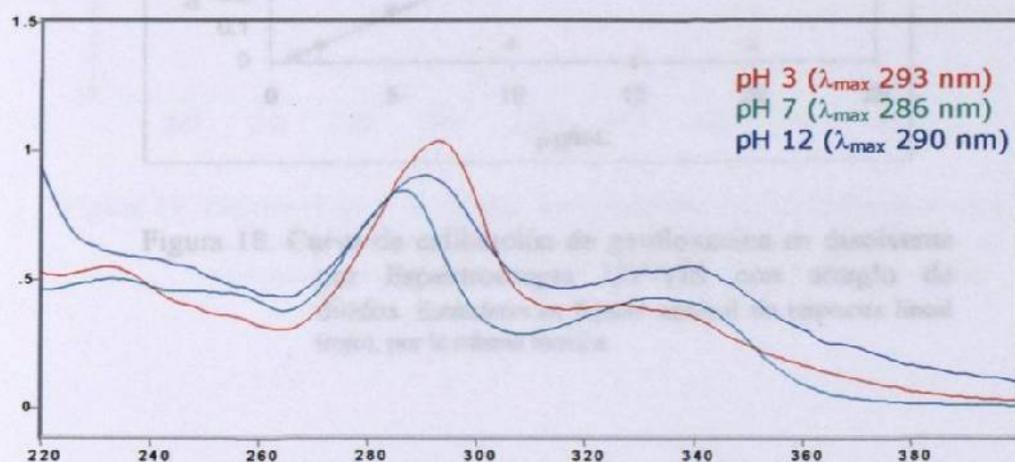
3.4.3 Análisis

La Figura 18 muestra una curva de calibración de la gatifloxacina en acetonitrilo y agua. La ecuación de la recta, también las absorbancias (0.001 – 0.002 absorbancias) al preparar y

3.4.2 Efecto en el Espectro de Absorción Debido a la Variación del pH

$\mu\text{g/mL}$

La gatifloxacina presenta la mejor respuesta a pH 3 con el buffer de citratos. En la Figura 17 se muestran los espectros de absorción del analito a los diferentes pH.



3.4.4 An. Figura 17. Espectros de absorción de la gatifloxacina a diferentes pH.

3.4.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectroscopia UV-VIS

En la Figura 19 se muestran los espectros de 1^o derivada de la curva de calibración de gatifloxacina en acetonitrilo y seminal.

La Figura 18 muestra una curva de calibración de gatifloxacina en acetonitrilo y seminal.

la ecuación de la recta, también las absorbancias (0.007 – 0.06) obtenidas al procesar y

leer estándares de gatifloxacina en líquido seminal con concentraciones de 10 a 20 $\mu\text{g/mL}$.

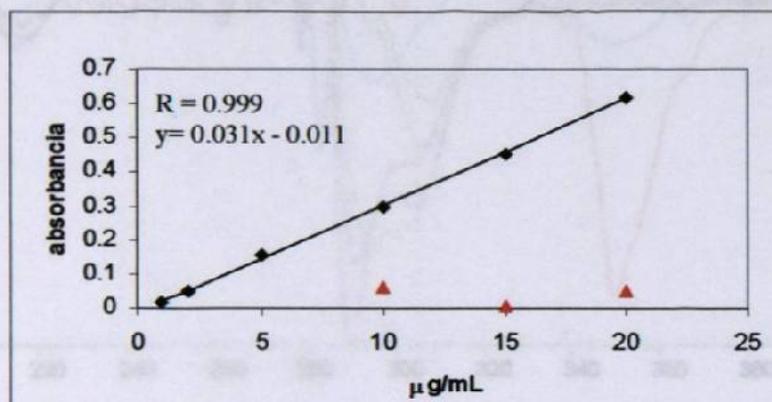


Figura 18. Curva de calibración de gatifloxacina en disolvente por Espectroscopia UV-VIS con arreglo de diodos. Estándares en líquido seminal sin respuesta lineal (rojo), por la misma técnica.

3.5. Espectrofluorimetría

3.4.4 Análisis de Gatifloxacina por Espectroscopia de Derivadas

3.5.1 Efecto en el Espectro de Emisión Debido a la Variación del pH

En la Figura 19 se muestran los espectros de 1ª derivada de líquido seminal de individuos que no estaban tomando gatifloxacina, así como dos estándares del analito en disolvente. Los estándares en matriz, no presentaron longitudes de onda adecuadas para la aplicación de la técnica de 1ª derivada para cuantificar gatifloxacina en líquido seminal a los diferentes pH. La gatifloxacina presenta la mejor respuesta a pH 3 con el buffer de citratos. El pH alcalino aumenta considerablemente la señal del sensor.

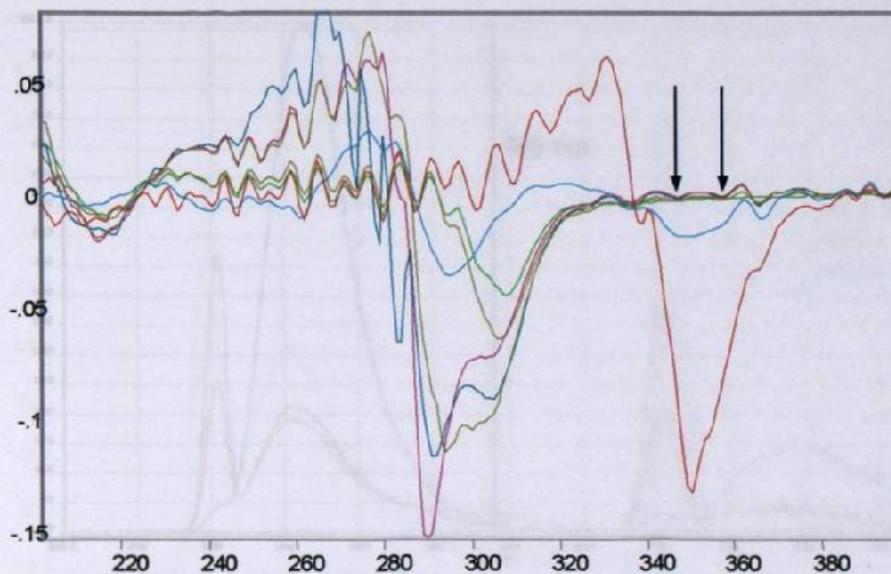


Figura 19. Espectros en 1ª derivada, de líquido seminal de individuos que no están tomando gatifloxacin. Estándares de gatifloxacin en disolvente (rojo y celeste) que prometían un cruce al cero (flechas negras).

3.5. Espectrofluorimetría

3.5.2 Análisis de Gatifloxacin por Espectrofluorimetría

3.5.1 Efecto en el Espectro de Emisión Debido a la Variación del pH

La Figura 21 muestra los espectros de emisión de estándares de gatifloxacin en líquido seminal a pH 3 con un intervalo de concentraciones es de 0.2 a 2 $\mu\text{g/mL}$. λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 486 nm.

En la Figura 20 se muestran los espectros de emisión del analito en líquido seminal a los diferentes pH. La gatifloxacin presenta la mejor respuesta a pH 3 con el buffer de citratos. El pH alcalino aumenta considerablemente la señal del semen.

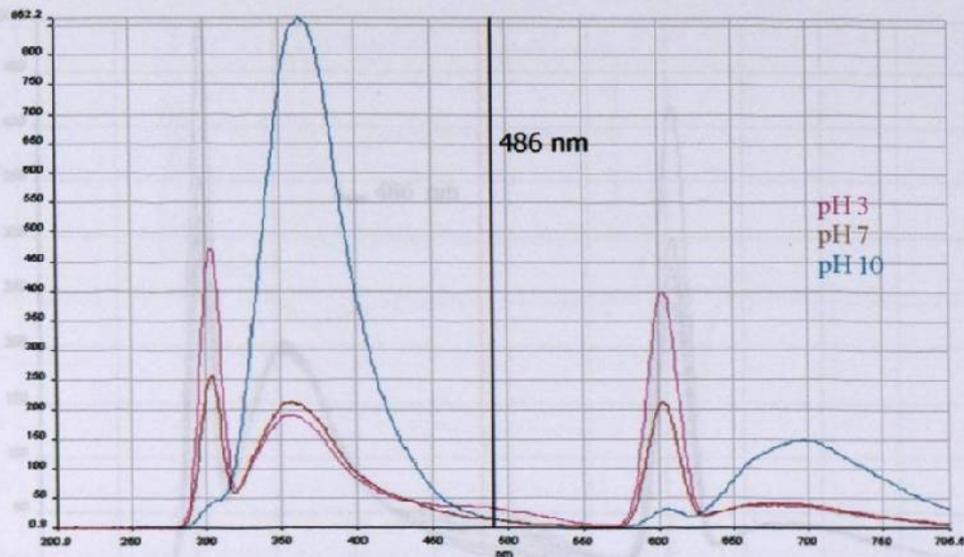


Figura 20. Espectros de emisión de fluorescencia de gatifloxacina en líquido seminal a diferentes pH. λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 486 nm.

Figura 21. Espectros de emisión de fluorescencia de gatifloxacina en líquido seminal. Intervalo de concentraciones de 0.2 a 2.0 $\mu\text{g/ml}$, pH 3, λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 486 nm.

3.5.2 Análisis de Gatifloxacina por Espectrofluorimetría

3.5.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectrofluorimetría de Derivadas

La Figura 21 muestra los espectros de emisión de estándares de gatifloxacina en líquido seminal a pH 3 con un intervalo de concentraciones es de 0.2 a 2 $\mu\text{g/mL}$. λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 486 nm.

La sensibilidad del método disminuye considerablemente. No se encontraron longitudes de onda adecuadas para la aplicación de la técnica de cruce al cero para cuantificar gatifloxacina en líquido seminal.

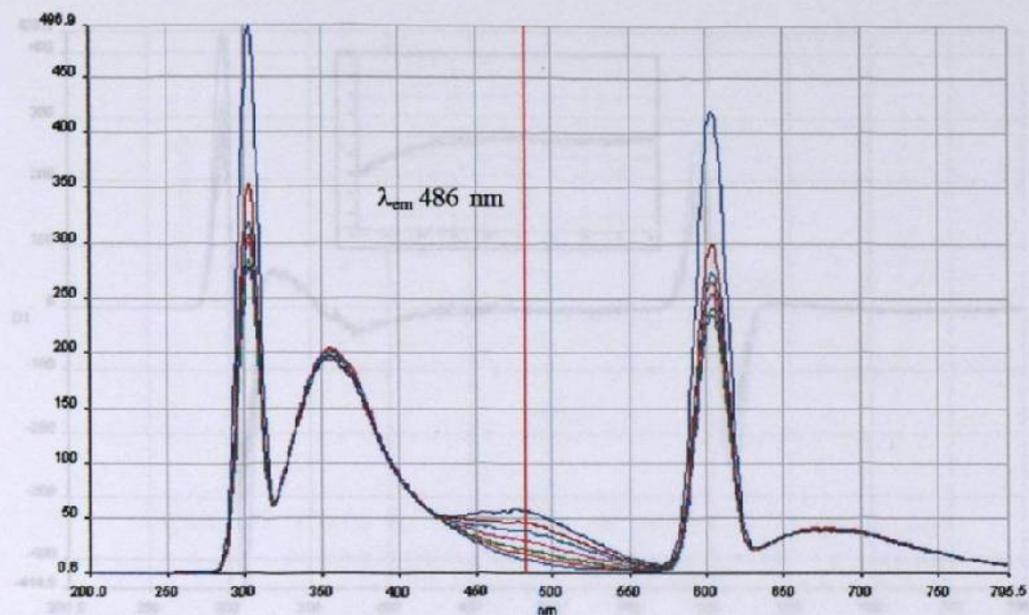


Figura 21. Espectros de emisión de fluorescencia de gatifloxacina en líquido seminal. Intervalo de concentraciones de 0.2 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$, pH 3, λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 486 nm.

3.5.4 Validación

3.5.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectrofluorimetría de Derivadas

3.5.4.1 Linealidad, Límites de Detección y Cuantificación.

En la Figura 22 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia en 1ª derivada de la curva de calibración de gatifloxacina en líquido seminal de la Figura 21. La sensibilidad del método disminuye considerablemente. No se encontraron longitudes de onda adecuadas para la aplicación de la técnica de cruce al cero para cuantificar gatifloxacina en líquido seminal.

seminal.

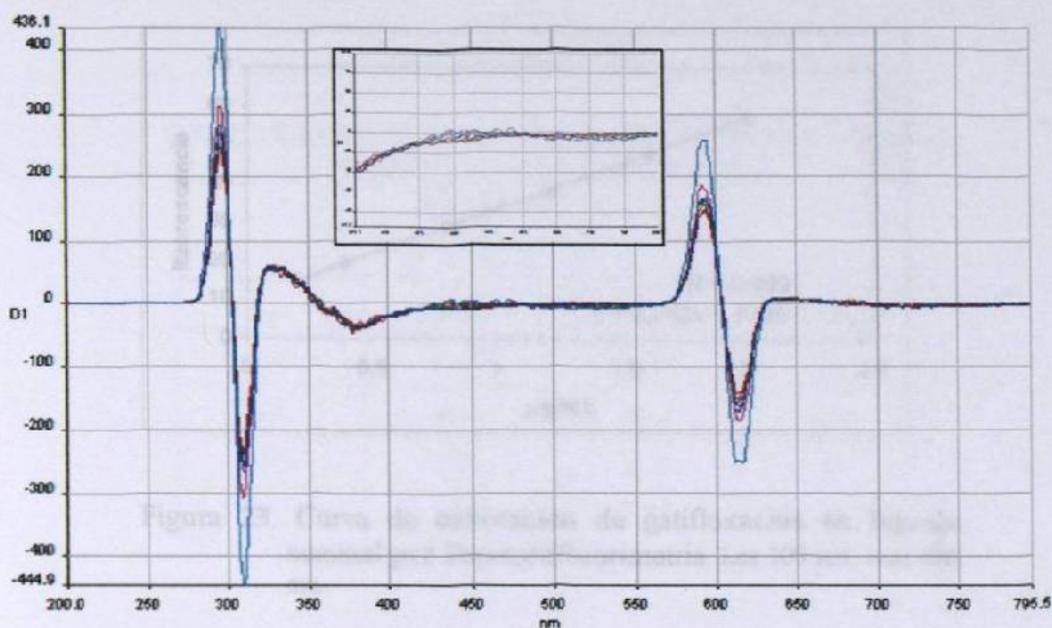


Figura 22. Espectros de emisión de fluorescencia de 1ª derivada de la gatifloxacina en líquido seminal. Concentraciones de 0.2 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$. pH 3, λ_{ex} 300 nm. En el recuadro superior central se observa un aumento de 382 a 560 nm.

3.5.4.2 Precisión y Reproducibilidad

El método tiene un coeficiente de variación de 1.3 % para las mismas concentraciones

3.5.4 Validación

calibración con una desviación estándar de 0.02. El porcentaje de recuperación es del 62 % \pm 10.

3.5.4.1 Linealidad, Límites de Detección y Cuantificación.

3.5.4.3 Robustez

El método por espectrofluorimetría modo *scan* para la determinación de gatifloxacina en líquido seminal presenta un coeficiente de regresión lineal de 0.999, con límites de detección y cuantificación de 0.06 y 0.2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La Figura 23 muestra la curva de calibración y la ecuación de la recta de gatifloxacina en líquido seminal.

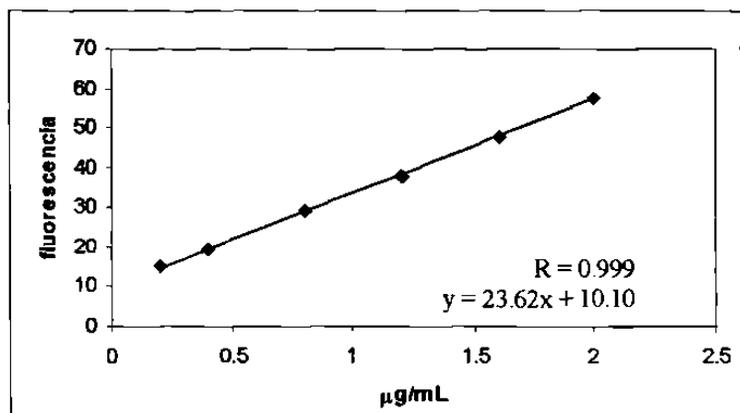


Figura 23. Curva de calibración de gatifloxacina en líquido seminal por Espectrofluorimetría. λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 486 nm.

3.5.4.2 Precisión y Porcentajes de Recuperación.

El método tiene un coeficiente de variación de 1.3 % para los valores intermedios de la curva de calibración con una desviación estándar de 0.7. El porcentaje de recuperación es del 62 % \pm 10.

3.5.4.3 Robustez.

Las TABLAS XVI y XVII muestran el resultado del análisis de robustez para espectrofluorimetría. El parámetro a evaluar fue la respuesta del analito y las variables evaluadas fueron: λ_{ex} , λ_{em} y el pH. El análisis mostró que las variables cuyas pequeñas modificaciones afectan las determinaciones por este método son λ_{ex} y el aumento de pH.

TABLA XVI

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ROBUSTEZ PARA
ESPECTROFLUORIMETRÍA**

VARIABLES: λ_{ex} y λ_{em}

| λ_{ex} | λ_{em} | V | Afectan |
|----------------|----------------|------|---------|
| 300 | 488 | 0.23 | No |
| 300 | 484 | 0.12 | No |
| 289 | 486 | 2.26 | Sí |
| 302 | 486 | 3.72 | Sí |

Si $|V| > s(2)^{1/2}$, la diferencia es significativa

TABLA XVII

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ROBUSTEZ PARA
ESPECTROFLUORIMETRÍA**

VARIABLE pH

| pH | V | Afectan |
|----|------|---------|
| 2 | 0.72 | No |
| 4 | 1.66 | Sí |

Si $|V| > s(2)^{1/2}$, la diferencia es significativa

3.5.4.4 Selectividad.

De las 30 muestras analizadas, correspondientes a individuos que no estaban en tratamiento con gatifloxacina, ninguna presentó señal en el espectro de emisión a la

longitud de onda que se esperaba la respuesta del analito (Figura 24). Por lo tanto, el líquido seminal no interfiere con la determinación de gatifloxacina.

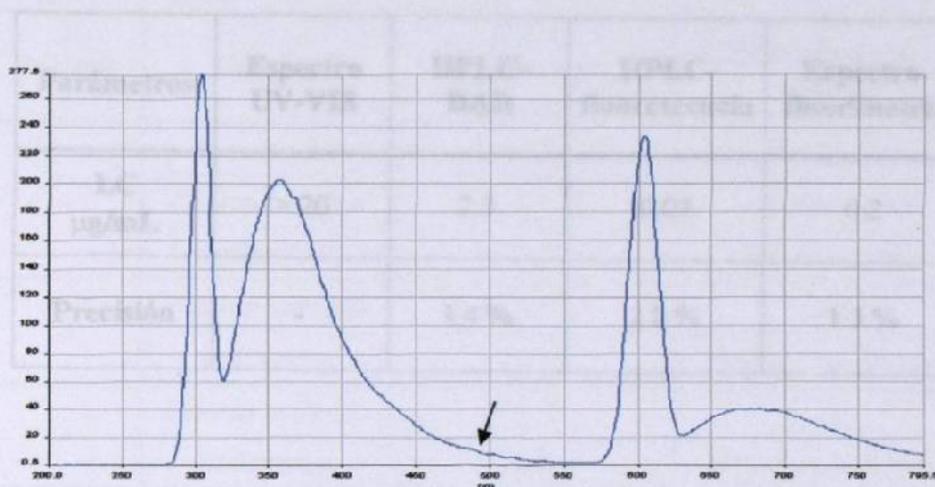


Figura 24. Espectro de emisión de fluorescencia de líquido seminal. λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 486 nm.

3.6 Comparación de los Métodos de Análisis

Los límites de cuantificación y coeficientes de variación de los métodos desarrollados y comparados se muestran en la TABLA XVIII. El método que ofrece la mayor sensibilidad es HPLC con detector de fluorescencia, sin embargo, el método por espectrofluorimetría resultó ser el más preciso, además de sencillo, rápido y de bajo costo.

TABLA XVIII

**LÍMITES DE CUANTIFICACIÓN DE GATIFLOXACINA Y
COEFICIENTES DE VARIACIÓN DE LOS MÉTODOS**

| Parámetros | Espectro UV-VIS | HPLC- DAD | HPLC- fluorescencia | Espectro- fluorimetría |
|---------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| LC µg/mL | > 20 | 2.3 | 0.03 | 0.2 |
| Precisión | - | 3.4 % | 2.8 % | 1.3 % |

3.7 Cuantificación de Gatifloxacin en Líquido Seminal de Pacientes

Los valores de la cuantificación de gatifloxacin obtenidos por ambos métodos se observan en la TABLA XIX. No se observó diferencia significativa con la prueba de varianza de un factor $\alpha = 0.05$, entre la cuantificación de gatifloxacin en líquido seminal por HPLC con detector de fluorescencia y por espectrofluorimetría. Los cromatogramas por HPLC-DAD, HPLC-fluorescencia, y el espectro de emisión de fluorescencia de las muestras del paciente 10, se observan en la Figura 25.

TABLA XIX

**NIVELES DE GATIFLOXACINA EN LÍQUIDO SEMINAL DE
PACIENTES EN TRATAMIENTO POR INFERTILIDAD**

| Paciente | Muestras | HPLC- fluorescencia µg/mL | Espectrofluorimetria µg/mL |
|----------|----------------|---------------------------------|-------------------------------|
| 1 | Semen total | 0.2 | Muestra insuficiente |
| | Plasma seminal | 0.1 | No detectable |
| | Sedimento | 0.1 | No detectable |
| 2 | Plasma seminal | 3.4 | 3.3 |
| | Sedimento | 3.3 | Muestra insuficiente |
| 3 | Plasma seminal | 5.4 | 5.1 |
| | Sedimento | 0.8 | Muestra insuficiente |
| 4 | Semen total | 6.1 | 6.0 |
| | Plasma seminal | 5.6 | 5.4 |
| | Sedimento | 1.0 | 1.1 |
| 5 | Semen total | 0.5 | 0.4 |
| 6 | Plasma seminal | 2.5 | 2.1 |
| | Sedimento | 0.4 | Muestra insuficiente |
| 7 | Plasma seminal | 4.0 | 3.9 |
| | Sedimento | 3.3 | 2.9 |
| 8 | Semen total | 0.1 | No detectable |
| | Plasma seminal | 0.1 | No detectable |
| | Sedimento | 0.1 | No detectable |
| 9 | Semen total | 6.6 | 5.7 |
| | Plasma seminal | 5.8 | 5.6 |
| | Sedimento | 1.8 | 1.4 |
| 10 | Semen total | 0.8 | 0.7 |

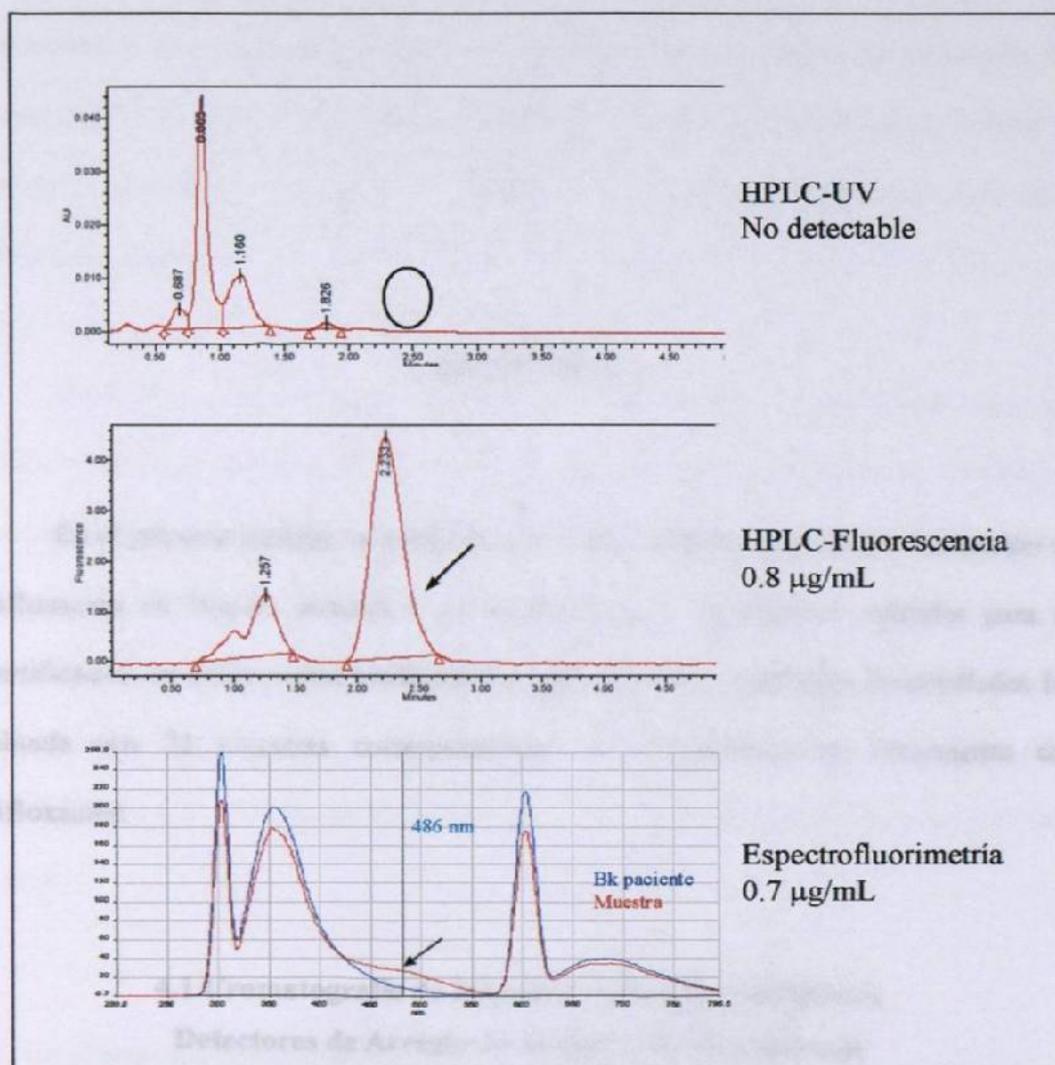


Figura 25. Cromatogramas por HPLC-DAD, HPLC-fluorescencia y espectro de emisión de fluorescencia, del líquido seminal del paciente 10. El círculo señala el t_R del analito por HPLC-DAD, las flechas indican la señal del analito para HPLC-fluorescencia y Espectrofluorimetría.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se probaron 4 técnicas analíticas para la determinación de gatifloxacina en líquido seminal y se desarrollaron y validaron 3 métodos para su cuantificación en dicha matriz biológica. La aplicación de los métodos desarrollados fue evaluada con 22 muestras correspondientes a 10 pacientes en tratamiento con gatifloxacina.

4.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detectores de Arreglo de Diodos y de Fluorescencia

Se trabajó con una columna fase reversa y los primeros sistemas de elución probados fueron los comúnmente usados con este tipo de columnas, como Metanol:H₂O y Acetonitrilo:H₂O, en diferentes proporciones, sin obtener resultados. Un analito con características de *zwitterion* como la gatifloxacina, no responde a los fenómenos normales de separación que ocurren en una columna fase reversa, la cual, se emplea para separar moléculas neutras y no compuestos con carga.

También se probó acidificar la fase con ácido fórmico (Vishwanathan, 2001), para mantener el analito en una de sus formas iónicas pero tampoco dio resultados. Es necesario para su separación y determinación que la fase móvil contenga un aditivo, llamado comúnmente reactivo de par iónico, el cual puede ser de carga contraria o de la misma carga del analito.

En el primero de los casos, el reactivo de par iónico (-) neutraliza la carga del analito (+) permitiéndole interactuar con la fase estacionaria, simulando un mecanismo de separación en fase reversa.

En el segundo de los casos, no ocurre un fenómeno típico de par iónico pero se explica por un modelo, donde el reactivo (+) se adsorbe a la superficie no polar C18, dejándola con carga (+), minimizando el área de superficie disponible para la adsorción del analito.

4.1.1 Equilibrar una Columna Fase Reversa con Reactivo de Par Iónico

Al adicionar un reactivo de par iónico en la columna, se presentó el hecho de que ésta no podría volver a usarse como una fase reversa convencional, es decir, tendría que usarse solamente para trabajar con el par iónico elegido (Quattrocchi, *et al.*, 1992).

Para embeber la columna fase reversa con reactivo de par iónico (TBA) fue necesario dejar pasar un mínimo de 200 volúmenes de fase móvil antes de empezar a

trabajar y obtener los beneficios del par iónico (Quattrocchi, *et al.*, 1992). Conforme transcurrió el tiempo de uso de la columna, ésta llegó a saturarse completamente, requiriendo menor tiempo de equilibrio; mientras tanto, fue necesario conectar la columna la noche anterior al día de trabajo con un flujo bajo de 0.1 a 0.2 mL/min y por la mañana aumentar el flujo a 0.4 mL/min, dejarla así por 5 h más, antes de inyectar y hacer una inyección de prueba para continuar o dejarla más tiempo en equilibrio.

4.1.1.1 Lavado de la Columna.

No fue necesario un cuidado especial para la columna al trabajar con el sistema de elección. La columna se guardó en fase móvil sin presentar problemas de precipitación. El hecho de no lavar la columna al finalizar el tiempo de trabajo, evitó el aumento en el tiempo de equilibrio.

4.1.2 Presencia de Aditivos en la Fase Móvil

En el sistema de elución seleccionado se empleó el fosfato de tetrabutil amonio (+) y se trabajó con un pH ácido, en el cual, la gatifloxacina se encuentra cargada positivamente. El efecto del TBA consiste en recubrir los OH de los residuos silanoles de la columna para evitar su interacción con el analito, esto reduce el volumen de retención de la gatifloxacina y optimiza la forma del pico (Bidlemeier, 1992).

Tomando en cuenta la naturaleza iónica de la gatifloxacina, la separación podría optimizarse con la presencia de una disolución amortiguadora en la fase móvil, en este

caso se usó un amortiguador de citratos, el cual minimizó las interacciones electrostáticas de la fase estacionaria con el analito, permitiendo así la elución de éste en zonas más estrechas. La adición de ácido cítrico a la fase móvil, no dio problemas con la solubilidad ni aumentó la presión de la columna, por lo cual no fue necesario usar una columna termostatada.

Se probó añadir a la fase móvil dodecil sulfato de sodio (SDS), para estrechar la base del pico del analito. Se añadieron concentraciones de 10 y 15 mM pero no se observaron cambios en el cromatograma, se aumentó la concentración a 20 mM y fue entonces cuando se observó un pico 0.2 min más estrecho. Con la adición de SDS a la fase móvil se presentaron problemas para disolverla, era una fase muy densa, aumentó la presión en la columna a pesar de usar una temperatura de 40 °C para disminuir la viscosidad, además la fase precipitaba en el recipiente. Como resultado de las características desfavorables de la fase móvil al añadir el SDS y la poca mejoría en la forma del pico, la adición de este reactivo a la fase móvil fue descartada.

4.2 Tratamiento de la Muestra

4.2.1 Fraccionamiento de la Muestra

Las muestras de semen fueron fraccionadas para analizar el semen, el plasma seminal y el sedimento. Durante la separación del plasma seminal del sedimento, fue

necesario decantar hasta el último residuo de plasma para asegurar que las concentraciones medidas de gatifloxacina correspondían a la determinación intracelular exclusivamente y descartar el hecho de estar cuantificando gatifloxacina del plasma remanente en el sedimento.

4.2.2 Preparación de la Muestra

4.2.2.1 Cartuchos de Extracción en Fase Sólida.

Un gran número de aplicaciones se han reportado para la extracción en fase sólida con buenos resultados. Los cartuchos de extracción en fase sólida *Oasis HLB* contienen un sorbente polimérico óptimo para SPE fase reversa, es un copolímero de balance hidrofílico-hidrofóbico (N-vinilpirrolidona - Divinilbenceno) que ofrece altas recuperaciones y reproducibilidad, fuerte retención y selectividad para compuestos ácidos, básicos, iónicos o no iónicos (Waters, 1999).

Dada la complejidad de la matriz biológica, al inyectarla directamente en el cartucho de SPE, se obtenía una muestra densa y turbia que no podía ser filtrada para inyectarse al HPLC, hecho por el cual no fue procesada y se buscó otra alternativa.

La desproteinización con acetonitrilo previa a la inyección al cartucho fue la segunda opción. En este caso, se obtuvo una muestra viable para el HPLC, pero al calcular los porcentajes de recuperación, éstos resultaron muy bajos. Se probó evaporar el disolvente con N_2 y resuspender en fase móvil para concentrar el analito pero esto no

resolvió el problema y los porcentajes de recuperación no eran constantes. La razón de los bajos porcentajes de recuperación se debe a la característica de *zwitterion* que tiene el analito, pues se eluía tanto con los lavados acuosos para eliminar la matriz biológica, como con los lavados con solvente para recuperar el analito. Lo anterior se comprobó al procesar los lavados para inyectar al HPLC.

4.2.2.2 Desproteínización con Acetonitrilo.

El disolvente de elección para el tratamiento de la muestra fue el acetonitrilo, ya que no presenta interferencias porque no absorbe en el ultravioleta, ni tiene emisión de fluorescencia.

Las muestras de semen desproteínizadas con un volumen igual de acetonitrilo y posteriormente diluidas en fase móvil, ofrecieron buenos porcentajes de recuperación. Pero se presentó otro problema, algunas muestras comenzaron a precipitar en los viales, finalmente todas lo hicieron, a temperatura ambiente y/o en refrigeración.

Para eliminar las proteínas remanentes, se probó añadir un segundo volumen de acetonitrilo y centrifugar nuevamente. Las muestras procesadas con una segunda centrifugación, no precipitaron en los viales y mantuvieron los buenos porcentaje de recuperación, razón por la cual, éste fue el tratamiento de muestra de elección para la fracción de semen, plasma seminal y sedimento.

Para el caso particular de los sedimentos inicialmente se midió su volumen y un volumen igual de acetonitrilo fue añadido para desproteínizar, se siguió el tratamiento de

muestra elegido, guardando siempre la proporción 1:2, en este caso el volumen final obtenido requería el uso de insertos en los viales para HPLC y para el caso de espectrofluorimetría no era un volumen suficiente para llenar la celda. Se optó entonces por añadir a los sedimentos 500 μ L de acetonitrilo para desproteinizar, siguiendo exactamente el mismo tratamiento que el semen y el plasma seminal, esto permitió obtener un volumen final mayor, suficiente para no usar inserto en el vial de HPLC y suficiente para llenar la celda del espectrofluorímetro. Esta dilución no afectó los límites de cuantificación para los sedimentos.

La revisión microscópica de los sedimentos sonicados y no sonicados, comprobó la ausencia de células. Esto confirma que el tratamiento de desproteinización con acetonitrilo, estandarizado para el tratamiento de muestras, es suficiente para asegurar la lisis celular y, por tanto, la liberación del contenido intracelular para hacer las determinaciones de gatifloxacina en éste. Por lo tanto, el proceso de sonicación no se aplicó para el tratamiento de los sedimentos de líquido seminal de pacientes en tratamiento con gatifloxacina.

4.3 Validación de HPLC con DAD y Fluorescencia en Líquido Seminal

4.3.1 HPLC con DAD

Aunque el detector ultravioleta con arreglo de diodos es un método lineal, preciso y con buenos porcentajes de recuperación, resultó poco sensible para la cuantificación del analito en la matriz biológica. Ofrece la ventaja de que permite identificar el analito mediante la comparación del espectro de la señal cromatográfica que se sospecha sea el analito, con el espectro de su estándar correspondiente; sin embargo, dada su baja sensibilidad, no sería el método de primera elección.

4.3.2 HPLC con Detector de Fluorescencia

El método validado por HPLC con detector de fluorescencia es lineal, preciso y con buenos porcentajes de recuperación. El detector de fluorescencia es casi 100 veces más sensible que el detector ultravioleta, hecho que lo coloca como el método de elección, dada su alta sensibilidad para el analito y el potencialmente escaso volumen de los especímenes clínicos.

4.3.3 Estabilidad del Analito en la Matriz Biológica

La gatifloxacina en muestras de semen congeladas es estable un mínimo de 60 días, esto permite almacenar muestras para procesarlas un mismo día sin correr el riesgo de ver alterados los resultados, además, disminuye los costos del análisis, pues el gasto de estándares y disolventes se realizaría una sola vez para cierto número de muestras. También permite almacenar el remanente de muestra en caso de requerirse posteriores aclaraciones.

4.4 Espectroscopia UV-VIS

4.4.1 Selección del Disolvente

Aunque se probaron como posibles disolventes el metanol y el agua, el disolvente de elección fue el acetonitrilo, pues a pesar de presentar los menores coeficientes de absortividad molar, ofrecía la mayor solubilidad para el analito y además estaba implícito en el tratamiento desarrollado para las muestras.

4.4.2 Efecto en el Espectro de Absorción Debido a la Variación del pH

La gatifloxacina por ser un *zwitteron*, es sensible a los cambios de pH, característica que se utilizó para aumentar la sensibilidad del método, es decir, buscar el pH en el cual el analito presentara la mejor respuesta.

Al alcalinizar el medio (pH 12), se observó un efecto batocrómico e hiperocrómico, respecto al pH neutro. Al acidificar el medio (pH 3) el efecto batocrómico es mayor que a pH alcalino, así como también el efecto hiperocrómico, razón por la cual se eligió trabajar a pH ácido.

4.4.3 Análisis de Gatifloxacina por Espectroscopia UV-VIS

Al trabajar con estándares de gatifloxacina en disolvente, no se presentó ningún problema, la respuesta fue lineal a concentraciones de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, se hizo evidente la baja sensibilidad del método. Al procesar estándares de gatifloxacina en la matriz biológica se pudo constatar el hecho, ya que no se obtuvo respuesta lineal a concentraciones de 10 a 20 $\mu\text{g/mL}$ y se estaba en un rango de absorbancias muy bajo (0.007 – 0.06 UA). En virtud de la escasa sensibilidad del método para detectar gatifloxacina en líquido seminal, la espectroscopia UV fue descartada y no se continuó con su validación.

4.4.4 Análisis de Gatifloxacin por Espectroscopia de Derivadas

La espectroscopia de derivadas es una técnica empleada para aumentar la estructura fina de las curvas espectrales, permite determinar la concentración de un analito cuyo espectro esté fuertemente solapado con otro pico, además, incrementa considerablemente la sensibilidad y selectividad (López-de-Alba, López-Martínez, 1993).

Como una alternativa para desarrollar un método que pudiera eliminar el tratamiento de muestra, se probó la llamada técnica de “cruce al cero” con los espectros en 1ª derivada para cuantificar la gatifloxacin en la región del espectro donde el líquido seminal no presentara señal, sin embargo, por la complejidad de la matriz biológica esto no fue posible.

Al aplicar la 1ª derivada a diferentes muestras desproteinizadas de líquido seminal de individuos que no estaban en tratamiento con gatifloxacin, se observó que cada muestra tiene un espectro personalizado, es decir, que si bien mantenían un patrón similar, éste no era exactamente el mismo y estas pequeñas variaciones entre máximos y mínimos hacían imposible estandarizar el método. Además de no encontrar un cruce al cero reproducible para todas las muestras, la sensibilidad del método por espectroscopia de derivadas, resultó bajo para cuantificar gatifloxacin en líquido seminal.

4.5 Espectrofluorimetría

4.5.1 Efecto en el Espectro de Emisión Debido a la Variación del pH

La emisión de fluorescencia de un analito *zwitterion* como la gatifloxacina, es sensible a las modificaciones en el pH.

El espectro de emisión de la gatifloxacina en líquido seminal a pH ácido, no presenta efectos de desplazamiento en las señales del analito ni de la matriz biológica, respecto al espectro a pH neutro. Pero sí ofrece un aumento en la emisión de fluorescencia para todas las señales. Tomando en cuenta que la gatifloxacina a pH ácido se encuentra protonada, es decir con carga (+), se le añadió SDS (-), pero no se observó ningún cambio en el espectro.

El pH alcalino no presenta ningún efecto en el espectro de emisión de fluorescencia para la señal del analito, pero las señales del líquido seminal aumentan considerablemente su emisión de fluorescencia y se desplazan hacia λ mayores. A pH alcalino la gatifloxacina presenta carga (-), se le agregó TBA (+), pero éste no causa ningún efecto en el espectro.

La mayor sensibilidad se obtuvo con el amortiguador de citratos a pH 3, razón por la cual se validó el método trabajando con este pH.

4.5.2 Análisis de Gatifloxacin por Espectrofluorimetría

La gatifloxacin en líquido seminal no presentó las mismas longitudes de onda de excitación y emisión que en disolvente, razón por la cual se realizó un *scan 3D* en el equipo para establecer la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión de mayor respuesta para el analito, donde no causara interferencia la matriz biológica.

Una ventaja del fenómeno de fluorescencia es la de poder aumentar la intensidad de emisión de un analito fluorescente, si se incrementa el poder de la fuente de excitación (Skoog, Leary, 1994). Todos los espectros de emisión se leyeron a 650 v. Se intentó aumentar la sensibilidad trabajando con 900 v, la sensibilidad aumenta, pero no se logró mejorar los límites de detección y cuantificación, ya que la respuesta de la matriz biológica aumenta al igual que la del analito. Las muestras de paciente leídas a 900 v se saturaban y había que diluirlas para leer, esas mismas muestras leídas a 650 v no presentaron problemas de saturación ni de detección.

4.5.3 Análisis de Gatifloxacin por Espectrofluorimetría de Derivadas

Se probó la llamada técnica de “cruce al cero” con los espectros en 1ª derivada para cuantificar la gatifloxacin en líquido seminal sin tratamiento de muestra, sin embargo, por la complejidad de la matriz biológica esto no fue posible.

Al aplicar la 1ª derivada a los estándares en matriz de la curva de calibración de gatifloxacina, no se encontró un cruce al cero, la sensibilidad del método por espectrofluorimetría de derivadas resultó menor que a modo de *scan* para cuantificar gatifloxacina en líquido seminal.

4.5.4 Validación

El método desarrollado por espectrofluorimetría resultó más sensible que HPLC-DAD, pero menos sensible que HPLC-fluorescencia; es un método lineal y de mayor precisión que los anteriores.

El porcentaje de recuperación es menor por espectrofluorimetría, la disminución se debe a una interferencia de la matriz biológica, debe recordarse que a diferencia de la técnica por HPLC, aquí nunca se encuentra el analito separado de la muestra. Sin embargo, la recuperación es un parámetro sacrificable si el método es lineal, preciso, reproducible y sirve para los fines propuestos, como es el caso.

En vista de que la matriz biológica nunca está separada del analito, no debe pasarse por alto el ensayo de robustez del cual se sabe que, variaciones en la longitud de onda de excitación, pueden traer consigo aumento en las señales de la matriz biológica y sobre todo disminución en la respuesta del analito. También debe cuidarse el aumento del pH

ya que, además de aumentar la respuesta del semen, disminuye la respuesta del analito sacrificando sensibilidad.

4.6 Comparación de los Métodos de Análisis

El método más sensible fue el de HPLC con detector de fluorescencia, característica que lo hizo el mejor candidato para analizar las muestras de pacientes en tratamiento. Aunado a su sensibilidad, el método es preciso y con buenos porcentajes de recuperación. Además, la técnica por HPLC, minimiza los efectos de matriz, al separar el analito de la misma, antes de detectarlo.

Por otro lado, el método desarrollado por espectrofluorimetría, como se mencionó anteriormente, fue el más preciso, además de sencillo, rápido y de bajo costo. A pesar de su porcentaje de recuperación menor, la nobleza de este método lo hizo candidato para analizar las muestras de pacientes en tratamiento, razón por la cual fue aplicado también.

4.7 Cuantificación de Gatifloxacina en Líquido Seminal de Pacientes

Las muestras de semen con volumen suficiente se fraccionaron en dos partes como se mencionó anteriormente, la primera para realizar la cuantificación en semen total y la segunda para separar el plasma seminal del sedimento y realizar las

cuantificaciones en cada uno de ellos. Sin embargo también se recolectaron muestras de escaso volumen, las cuales fueron procesadas únicamente como semen total. Por otro lado, se realizaron cuantificaciones únicamente en plasma seminal y sedimento, para aquellas muestras que el laboratorio de andrología mandó ya centrifugadas.

No se encontró diferencia significativa entre la cuantificación de gatifloxacina en líquido seminal por HPLC con detector de fluorescencia y por Espectrofluorimetría (TABLA XIX), por tanto ambos métodos desarrollados se consideran viables para la cuantificación de gatifloxacina en muestras de pacientes.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

1. La hipótesis se acepta. Se desarrollaron y validaron dos métodos útiles para cuantificar gatifloxacin en líquido seminal, por HPLC con detector de fluorescencia y por Espectrofluorimetría.
2. El método desarrollado y validado por HPLC con detector de fluorescencia presenta mayor sensibilidad y puede emplearse para la cuantificación de gatifloxacin en líquido seminal de pacientes en tratamiento.
3. El método desarrollado y validado por Espectrofluorimetría es rápido, sencillo, económico y permite la cuantificación de gatifloxacin en líquido seminal de pacientes en tratamiento.

4. El método desarrollado y validado por HPLC con DAD permite la cuantificación de gatifloxacina en líquido seminal de pacientes en tratamiento, sólo cuando ésta se encuentra en concentraciones mayores a los 2 µg/mL.
5. La técnica de Espectroscopia UV-VIS no es lo suficientemente sensible para cuantificar gatifloxacina en líquido seminal de pacientes en tratamiento.

5.2 Perspectivas

1. Desarrollar un protocolo de pacientes en tratamiento con gatifloxacina, que tengan diagnóstico andrológico de infertilidad conyugal con infección por *Chlamydia* y/o *Mycoplasma* y correlacionar estadísticamente los niveles del fármaco cuantificado en el líquido seminal con la presencia de bacterias y alteraciones en el seminograma.
2. Desarrollar las técnicas de tratamiento de muestra para otras matrices biológicas, para permitir la aplicación de los métodos desarrollados en la cuantificación de gatifloxacina en dichas matrices.

Referencias

- Arredondo de A. G. Anatomía del Desarrollo Laboratorio. Interamericana S.A. de C.V. México, D.F., 1987. pp 7, 8,13.
- Ballesteros O., Vilchez J. L., Navalón A. Determination of Antibacterial Ofloxacin in Human Urine and Serum Samples by Solid-phase Spectrofluorimetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30: 1103-1110. 2002
- Bernard H. J. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. 9ª Edición. Masson-Salvat Medicina. 1991. pp 513, 514, 1427.
- Bidlingmeyer B. A. Practical HPLC Methodology and Applications. John Wiley & Sons, 1992. pp 153-157, 161-164.
- Borner K., Hartwig H., Lode H. Determination of Gatifloxacin in Human Serum and Urine by HPLC. *Chromatographia Supplement*, 52: S105-S107. 2000
- Breen J., Skuba K., Grasela D. Phototoxicity and Hepatotoxicity do not appear occur Safety and Tolerability of Gatifloxacin, an advanced-generation, 8-methoxy fluoroquinolone. *Journal of Respiratory Disease*. 20, (11): S70-S76. 1999.
- Bristol-Myers Squibb Company. TEQUIN™ (gatifloxacin) Tablets TEQUIN™ (gatifloxacin) Injection. Princeton, NJ 08543 USA. 2000.
- Calderón J. E. Aplicación Clínica de Antibióticos y Quimioterápicos. Editorial Méndez Cervantes. México, 1991. pp 148-153, 185, 186, 190-193.
- Carlucci G. Review Analysis of Fluoroquinolones in Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 812, 343-367. 1998.

- Christian G. D. Analytical Chemistry. 5th Edition. Editorial John Wiley and Sons, N.Y. 1994. pp 33-34.
- Du L. M., Lin A. P., Yang Y. Q. Spectrofluorimetric Determination of Certain Fluoroquinolone Trough Charge Transfer Complex Formation. *Analytical Letters*. **37**, (10): 2175-2188. 2004.
- Du L. M., Yang Y. Q., Wang Q. M. Spectrofluorimetric Determination of Certain Quinolone Trough Charge Transfer Complex Formation. *Analytica Chimica Acta*. **516**: 237-243. 2004.
- Du L. M., Yao H. Y., Fu M. Spectrofluorimetric Study of the Charge-Transfer Complexation of Certain Fluoroquinolones with 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **L**, (61): 281-286. 2005.
- FDA. 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). 2001. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> o <http://www.fda.gov/cvm>
- Finegold S. M., Baron E. J.. Diagnóstico Microbiológico Bailey/Scott. 7^a edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, 1989. pp. 505-508, 510-512.
- Foye W. O., Lemke T. L., Williams D. A. Principles of Medicinal Chemistry. 4th Edition. Williams & Williams. 1995. pp 768-769.
- Fukuda H., Hiramatsu K. Primary Targets of Fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**, (2): 410-412. 1999.
- Gradelski E., Kolek B., Bonner D., Fung-Tome J. Bactericidal mechanism of gatifloxacin compared with other quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **49**, (1): 185-188. 2002.
- Gringauz A. Introduction to Medicinal Chemistry how drugs act and why. Wiley-VCH Inc., 1997. pp 265-271.

- Honeybourne D., Banerjee D., Andrews J., Wise R. Concentrations of Gatifloxacin in Plasma and Pulmonary Compartments Following a Single 400 mg Oral Dose in Patients Undergoing Fibre-Optic Bronchoscopy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 48: 63-66. 2001.
- Jeyendran R. S.. Interpretation of Semen Analysis Results a Practical Guide. Cambridge University Press, 2000. pp 83.
- Keck C., Gerber-Schafer C., Clad A., Wilhelm C., Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Repro. Update.* 4, (6): 891-903. 1998.
- Levy R., Layani-Milon M. P., Giscard D'E. S., Najjioullah F., Lornage J., Aymard M., Lina B. Screening for *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* infection in semen from asymptomatic male partners of infertile couples prior to *in vitro* fertilization. *Int J Androl.* 22, (2): 113-8. 1999.
- Lian N., Sun C. Y., Zhao H. C.. Fluorimetric Determination of Gatifloxacin (Abstract). *Fenxi Ceshi Xuebao (Publication type Journal, language chinese).* 21 (1): 79-81. 2002.
- Liang H., Kays M. B., Sowinski K. M. Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma. *Journal of Chromatography B,* 772: 53-63. 2002.
- López de A. P. L., López M. L.. Una Introducción a la Espectrometría de Derivadas. *Educación Química.* 4,(3): 160-170. 1993.
- Lutsar I., Friedland I. R., Wubbel L., McCoig C. C., Jafri H. F., Winston N. G., Ghaffar F., McCracken G. H. Jr. Pharmacodynamics of Gatifloxacin in Cerebrospinal Fluid in Experimental Cephalosporin-Resistant Pneumococcal Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 42, (10): 2650-2655. 1998.
- Machida M., Izawa S., Hori W., Ishida R., Uchida H. Pharmacokinetics of Gatifloxacin, a new Quinolone, and its Enantiomers. II. Enantioselective Method for the Determination of Gatifloxacin and its Application to Pharmacokinetic Studies in Animals (Abstract). *Nippon Kagaku Ryoho Gakkai Zasshi (Journal written in Japanese).* 47, (2): 124-130. 1999.

- Marona H. R. N., Lopes C. C. G. O., Cardoso S. G.. Non-aqueous Titration of Gatifloxacin in Pharmaceutical Formulations using Perchloric Acid. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 22, (4): 339-342. 2003.
- Miller J. C., Miller J. N.. Estadística para Química Analítica. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana. EUA, 1993. pp. 96-98.
- Montgomery D. C.. Diseño y Análisis de Experimentos. Ed. Limusa Wiley. 2004. pp 63, 64, 343-347.
- Naber K. G.. The Role of Quinolones in the Treatment of Chronic Bacterial Prostatitis. *Medizin Verlag GmbH München*. 19, (3): S170-S177. 1991.
- Nakashima M., Uematsu T., Kosuge K., Kusajima H., Ooie T., Masuda Y., Ishida R., Uchida H.. Single- and Multiple-Dose Pharmacokinetics of AM-1155, a New 6-Fluoro-8-Methoxy Quinolone, in Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39, (12): 2635-2640. 1995.
- Nguyen H. A., Grellet J., Ba B. B., Quentin C., Saux M. C.. Simultaneous Determination of Levofloxacin, Gatifloxacin, and Moxifloxacin in Serum by Liquid Chromatography with Column Switching. *Journal of Chromatography B*. 810, (1): 77-83. 2004.
- Overholser B. R., Kays M. B., Sowinski K. M.. Determination of Gatifloxacin in Human Serum and Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Journal of Chromatography B*, 798: 167-173. 2003.
- Perez R. T., Martínez L. C., Sanz A., Bravo E.. Separation and Simultaneous Determination of Quinolone Antibiotics by Capillary Zone Electrophoresis. *Chromatographia*, 49, (7/8): 419-423. 1999.
- Quattrocchi O. A., Abelaira de A. S. I., Laba R. F.. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires, 1992. pp. 324-326.
- Rubinstein E.. History of Quinolones and Their Side Effects. *Chemotherapy* 47, (3): 3-8. 2001.

- Skoog D. A., Leary J. J. Análisis Instrumental. Ed. McGraw-Hill. España, 1994. pp. 208-211.
- Swartz M. E., Krull I. S. Analytical Method Development and Validation. Marcel Dekker, INC.. USA, 1997. pp 53.
- Takei M., Fukuda H., Yasue T., Hosaka M., Oomori Y. Inhibitory Activities of Gatifloxacin (AM-1155), a Newly Developed Fluoroquinolone, against Bacterial and Mammalian Type II Topoisomerasas. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42, (10): 2678-2671. 1998.
- Vishwanathan K., Bartlett M. G., Stewart J. T. Determination of Gatifloxacin in Human Plasma by Liquid Chromatography/electrospray tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in mass spectrometry: RCM*. 15, (12): 915-919. 2001.
- Waters Corporation. Oasis® Sample Extraction Products. 1999.
- Wise R., Andrews J. M., Ashby J. P., Marshall J. A Study to Determine the Pharmacokinetics and Inflammatory Fluid Penetration of Gatifloxacin Following a Single Oral Dose. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44: 701-704. 1999.
- Zhou H. H., Gao S. M., Wang E. H., Shen W. B., Sheng L. S. Impurity Analysis and their Structure Determination of gatifloxacin (Abstract). *Yaoxue Xuebao (Publication type Journal, language chinese)*. 37, (6): 462-464. 2002.
- Zhu M., Wang R., Fang Y., Pei W., Nie W. M., Wang Z. X. HPLC Determination of Gatifloxacin Mesylate in Human Plasma and Urine (Abstract). *Yaowu Fenix Zazhi (Publication type Journal, language chinese)*. 23, (1): 53-55. 2003.

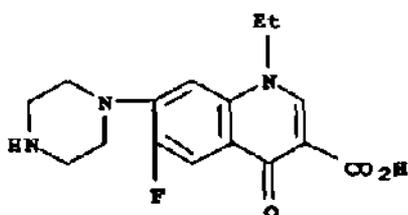
APÉNDICE

Estructuras de algunas fluoroquinolonas

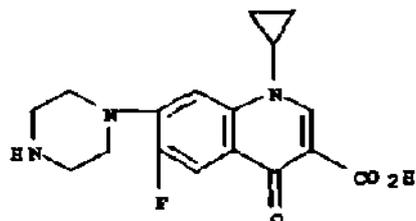
APÉNDICE

Estructuras de algunas fluoroquinolonas

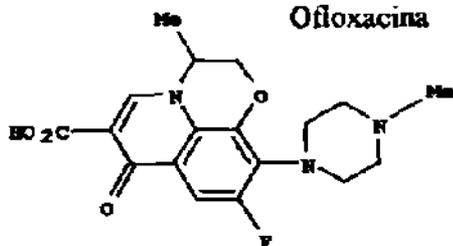
Norfloxacinina



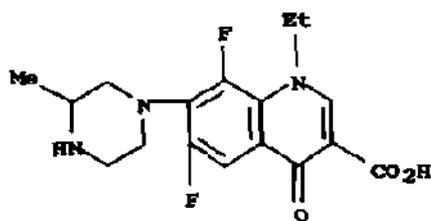
Ciprofloxacina



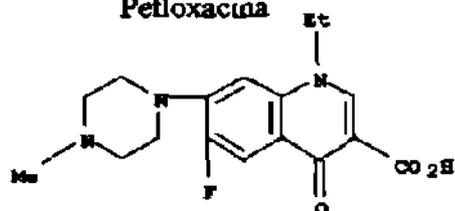
Ofloxacinina



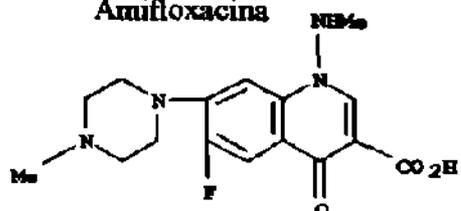
Lomefloxacina



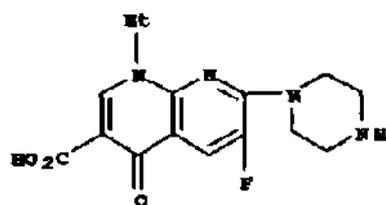
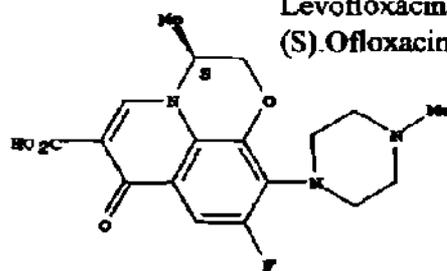
Pefloxacin



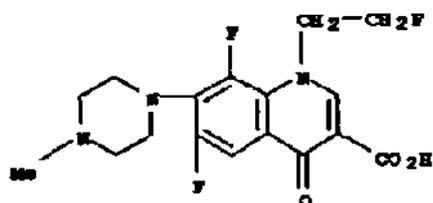
Amifloxacin



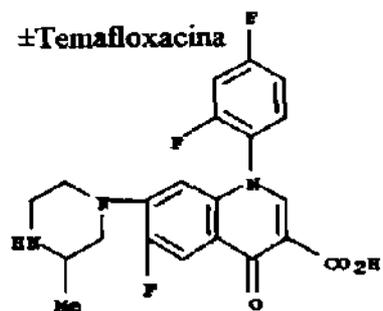
Enoxacin

Levofloxacin
(S)-Ofloxacin

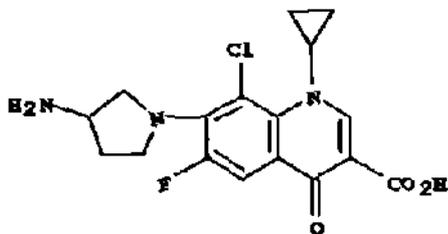
Fleroxacin



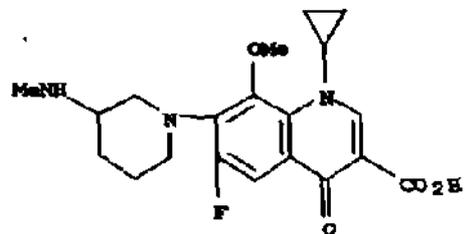
±Temafloxacin



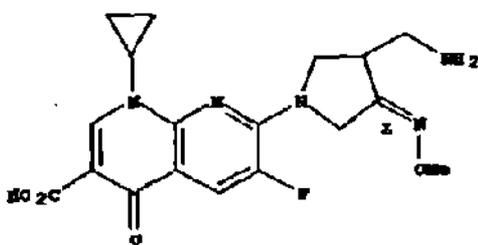
Clinafloxacin



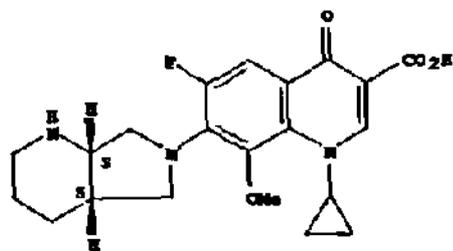
Balofloxacin



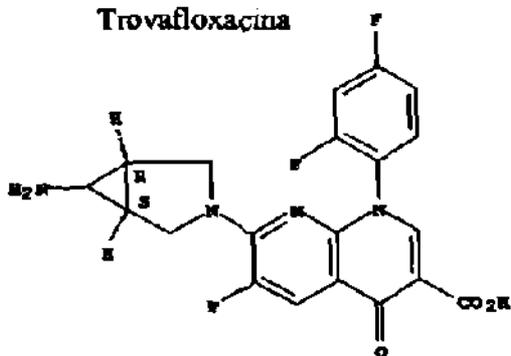
Gemifloxacin



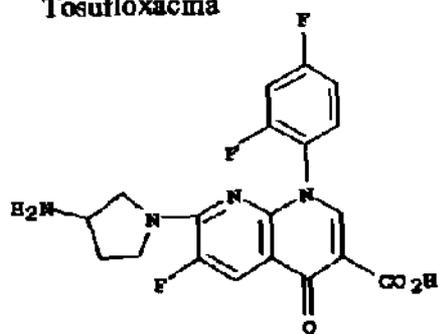
Moxifloxacin



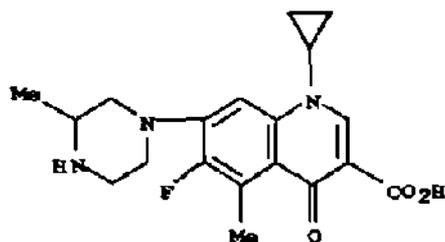
Trovafoxacin



Tosufloxacin



Грепфлoкacинa, Тoмeфлoкacинa



Pazufloxacin

