UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

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

Por

M. C. NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA

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

Agosto de 2006

TD
QR82
.N6
C38
2006
c.1

1080130341

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

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

Por

M.C. NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA

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

Agosto del 2 0 0 6

BURadi Rang I Fil
A
F NDO
TESIS DOCTORADO

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

Aprobación de la Tesis:

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

DR. LUCIO VERA CABRERA
Co- Director de Tesis

DR. OLIVERIO WELSH LOZANO
Co-Director de Tesis

DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Comisión de Tesis

DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Comisión de Tesis

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

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

Presentado por:

M.C. Norma Cecilia Cavazos Rocha

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

FIRMAS

DIRECTOR

Dra. María de la Luz Salazar Cavazos

CO-DIRECTOR

Dr. Lucio Vera Cabrera
Co-Director

CO-DIRECTOR

Dr. Oliverio Welsh Lozano
Co-Director

RESUMEN

M.C. Norma Cecilia Cavazos Rocha **Fecha de graduación: Agosto 2006**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

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

Número de páginas: **125** **Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Química Biomédica**

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y Método de Estudio:

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

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

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

Conclusiones y Contribuciones

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

FIRMA DEL DIRECTOR

Dra. Ma. De la Luz Salazar Cavazos.

DEDICATORIA

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

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

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

A mis hermanos, Connie, Isaac y Paco.

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque gracias a Él todo es posible.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A Agustín, por su buena disposición y su apoyo.

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

A CONACYT por el apoyo económico personal durante este trabajo

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

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α	Factor de selectividad
ACN	Acetonitrilo
AMX	Amoxicilina
ANOVA	Análisis de varianza
β	Beta
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
C_8	Columna cromatográfica de fase inversa de octasilano
C_{18}	Columna cromatográfica de fase inversa de octadecilsilano
CV	Coeficiente de variación
°	Grado
DAD	Detector de arreglo de diodos
DDS	4,4 diamino dimetil sulfona
DNBC	Dinitrobencilcloruro
ds	Desviación estándar
FDNB	Fluoro 2,4 dinitrobenceno
FR	Factor de respuesta
g	Gramos
GR	Garenoxacina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
kg	Kilogramo
λ	Longitud de onda
λex	Longitud de onda de excitación
λem	Longitud de onda de emisión
L	Litro
LZ	Linezolid
m	Pendiente de la curva de calibración
mg	Miligramo
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MIC_{50}	Concentración mínima inhibitoria del 50% del crecimiento bacteriano

MIC_{90}	Concentración mínima inhibitoria del 90% del crecimiento bacteriano
µg	Microgramo
µL	Microlitro
M	Molar
mL	Mililitro
µm	Micrómetro
min	Minuto
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
N	Número de platos teóricos
NaOH	Hidróxido de sodio
NaH_2PO_4	Fosfato diácido de sodio$_4$
k'	Factor de capacidad
K_2HPO_4	Fosfato monoácido de potasio
OPA/2 ME	Ortoftaldehído/ 2 mercaptoetanol
PABA	Ácido p-aminobenzoico
pKa	Logaritmo inverso de la constante de acidez
pH	Potencial hidrógeno
%	Porciento
R	Resolución
RSD	Desviación estándar relativa
S^2	Varianza
SMX	Sulfametoxazol
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
t_0	Tiempo muerto
tp	Tamaño de partícula
TBA	Fosfato de tetrabutilamonio
tR	Tiempo de retención
TMP	Trimetoprim
t0	Tiempo muerto
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético

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

INDICE

CAPÍTULO **Página**

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Micetoma 1
1.1.1 Definición 1
1.1.2 Distribución mundial 1
1.1.3 Etipoatogenia 2
1.1.4 Cuadro clínico 4
1.1.5 Micetoma en México 4
1.1.6 Terapia 6

1.2 Actinomicetoma 7
1.2.1 Tratamiento de actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis.* 7

1.3 Características de los antimicrobianos propuestos en el tratamiento de actinomicetoma por *N. brasiliensis.* 13

1.4 Antecedentes 28
1.4.1 Métodos analíticos para la determinación de antimicrobianos 28
1.4.1.1 Amikacina 29
1.4.1.2 Amoxicilina-Ácido clavulánico 30
1.4.1.3 Linezolid 32
1.4.1.4 Garenoxacina 32
1.4.1.5 Sulfametoxazol-Trimetoprim 33

1.4.2 Tratamiento de la muestra 34
1.4.2.1 Desproteinización 34
1.4.2.2 Extracción en fase sólida 35
1.4.2.3 Análisis de antimicrobianos en fluidos biológicos 35
1.4.2.4 Análisis de antimicrobianos en tejido 36

1.4 Justificación 37
1.5 Objetivo general 38
1.6 Objetivos específicos 38

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipos 39
2.1 Materiales 40
2.3 Reactivos 41

2.4 Métodos
2.4.1 Preparación de soluciones
2.4.1.1 Reactivos 42
2.4.1.2 Estándares 43
2.4.2 Condiciones cromatográficas 44

2.4.3 Optimización del sistema cromatográfico 45

2.4.4 Validación del sistema cromatográfico
2.4.4.1 Linealidad 48
2.4.4.2 Límite de detección 49
2.4.4.3 Límite de cuantificación 49
2.4.4.4 Precisión 50
2.4.4.5 Robustez 50
2.4.4.6 Estabilidad 52

2.4.5 Métodos de tratamiento de muestra
2.4.5.1 Elección del solvente de desproteinización 52
2.4.5.2 Elección del volumen de plasma 53

2.4.6 Desarrollo de métodos
2.4.6.1 Plasma 54
2.4.6.2 Tejido de ratón infectado con actinomicetoma 54

2.4.7 Validación de métodos
2.4.7.1 Linealidad 55
2.4.7.2 Límite de detección 56
2.4.7.3 Límite de cuantificación 57
2.4.7.4 Precisión 57
2.4.7.5 Exactitud 57
2.4.7.6 Selectividad 58
2.4.7.7 Estabilidad 59

2.4.8 Análisis de Amikacina por CLAR-Fluorescencia con OPA/2ME 59

2.4.9 Aplicabilidad
2.4.9.1 Determinación en plasma 60
2.4.9.2 Tejido de ratón infectado con actinomicetoma 60

3 RESULTADOS

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

3.1.2.2 Límites de detección y cuantificación 66
3.1.2.3 Precisión intradía e interdía 68
3.1.2.4 Robustez 69
3.1.2.5 Estabilidad 70

3.1.3 Validación del sistema CLAR con detección por Fluorescencia 71
3.1.3.1 Intervalo lineal 71
3.1.3.2 Límites de detección y cuantificación 73
3.1.3.3 Precisión intradía e interdía 73
3.1.3.4 Robustez 74

3.1.4 Análisis d Amikacina por CLAR-Fluorescencia OPA/2ME 75

3.2 Métodos analíticos desarrollados en plasma y tejido 77

3.2.1 Tratamiento de la muestra
3.2.1.1 Elección del solvente 77
3.2.1.2 Volumen de la muestra 78

3.2.2 Validación del método cromatográfico para la determinación de antimicrobianos en plasma: CLAR-UV 254 nm 79
3.2.2.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación 80
3.2.2.2 Precisión 82
3.2.2.3 Exactitud 84
3.2.2.4 Selectividad 84
3.2.2.5 Estabilidad 85

3.2.3 Validación del método cromtatográfico para la determinación de antimicrobianos en plasma: CLAR -Fuorescencia
3.2.3.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación 87
3.2.3.2 Precisión 87
3.2.3.3 Exactitud 88

3.2.4 Validación del método cromtatográfico para la determinación de antimicrobianos en tejido de ratón infectado con actinomicetoma: CLAR-UV 254 nm
3.2.4.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación 89
3.2.4.2 Precisión 91
3.2.4.3 Exactitud 92
3.2.4.4 Selectividad 92

3.2.5 Aplicaciones
3.2.5.1 Determinaciones en plasma 93
3.2.5.2 Determinaciones en tejido de ratón infectado con actinomicetoma 94

4 DISCUSIÓN

4.1 Desarrollo del método 97
4.1.1 Separación cromatográfica 97
4.1.2 Análisis de Ácido clavulánico 105
4.1.3 Análisis de Amikacina 105
4.1.4 Métodos de detección 106

4.2 Tratamiento de muestras 107

4.3 Validación de los métodos desarrollados
4.3.1 Intervalo lineal, límites de detección y de cuantificación 109
4.3.2 Precisión 110
4.3.3 Exactitud 111
4.3.4 Robustez 112
4.3.4 Estabilidad 112

4.4 Aplicabilidad
4.4.1 Determinaciones en plasma 113
4.4.2 Determinaciones en tejido de ratón infectado con actinomicetoma 114

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones 116

5.2 Perspectivas 117

BIBLIOGRAFIA 118

ÍNDICE DE TABLAS

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

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

ÍNDICE DE FIGURAS

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

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

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Micetoma

1.1.1 Definición

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

1.1.2 Distribución mundial

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

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

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

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

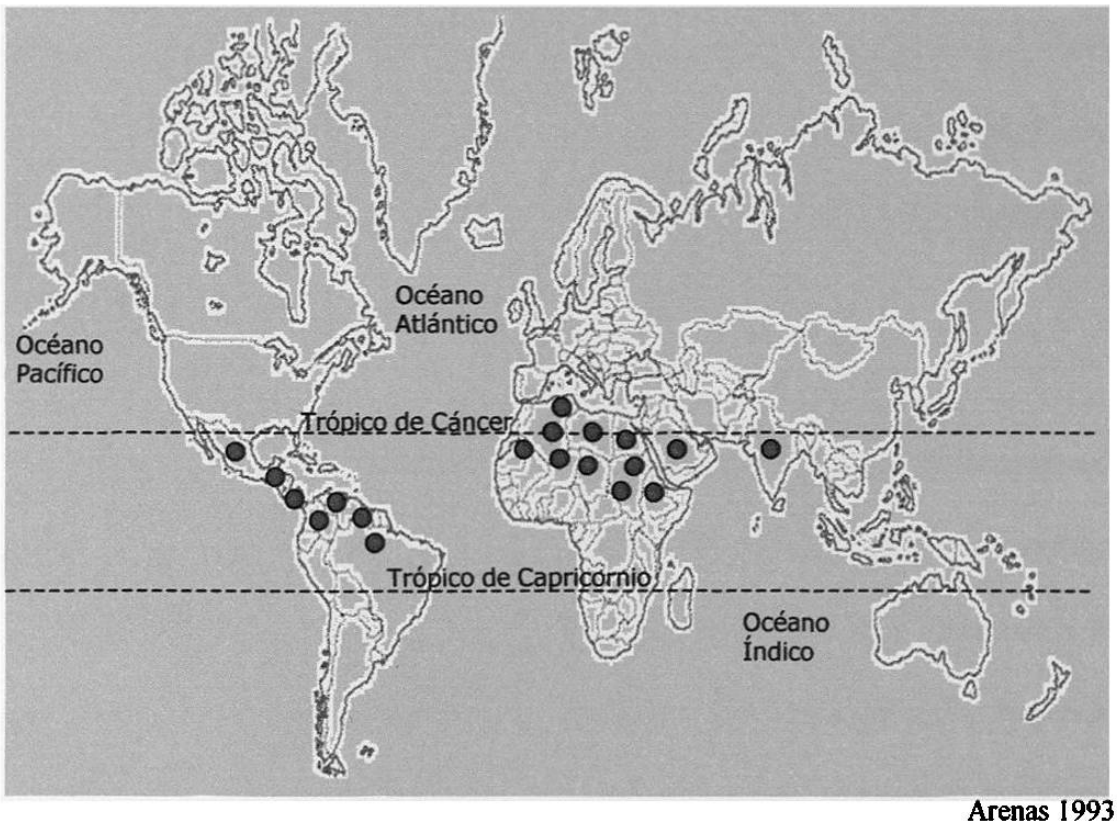

Figura 1. Distribución mundial del micetoma.
El color rojo indica los lugares de mayor frecuencia

1.1.3 Etiopatogenia

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

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

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

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

1.1.4 Cuadro clínico

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

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

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

1.1.5 Micetoma en México.

TABLA I

AGENTES CAUSALES DE MICETOMA

Eumicetoma	Actinomicetoma
	Nocardia brasiliensis*
Madurella mycetomatis*	*Actinomadura madurae*
Monosporium apioespermun	*Streptomyces somaliensis*
Madurella grisea	*Nocardia asteroides*
Leptosphaeria senegaliensis	*Actinomadura pelletieri*
	Nocardia transvalensis
	Nocardiopsis dassonvillei

* Agente causal mas frecuentemente aislado Welsh 1992

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

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

1.1.6 Terapia

Eumicetomas

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

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

Actinomicetomas

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

1.2 Actinomicetoma

1.2.1 Tratamiento de actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis.*

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

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

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

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

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

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

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

TABLA II

EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LA MIC PARA AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *N. brasiliensis*

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

(Gómez-Flores 2004)

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

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

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

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

TABLA III

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

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

* El número indica los animales con el grado de infección. (Gómez-Flores 2004)

TABLA IV

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

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

(Vera-Cabrera 2004)

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

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

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

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

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

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

1.3.1 Amikacina (sulfato de amikacina)

Su fórmula estructural es la siguiente:

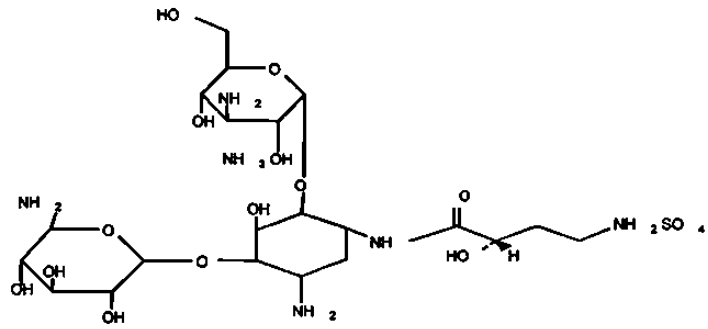

Figura 3. Estructura química del sulfato de amikacina

Nombre químico: sulfato de (*S*)-*O*-3-Amino-3-desoxi-α-d-glucopiranosil-(1→4)-O-(6-amino-6-desoxi-α-D-glucopiranosil-(1→6))-N^3-(4-amino-L-2-hidroxibutiril)-2-desoxi-L-estreptamina.

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

Peso molecular: 717 g/mol

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

Mecanismo de acción

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

Espectro antibacteriano:

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

Absorción, distribución y excreción:

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

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

Usos

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

Actividad en contra de Nocardia

En el 2004, al evaluar la actividad de varios antimicrobianos contra *Nocardia brasiliensis*, Gómez y colaboradores reportaron para la amikacina una MIC_{50} de 2 µg/mL y MIC_{90} de 4 µg/mL (Gómez-Flores 2004).

1.3.2 Amoxicilina-Ácido Clavulánico

Amoxicilina:

La fórmula estructural de este antimicrobiano es la siguiente:

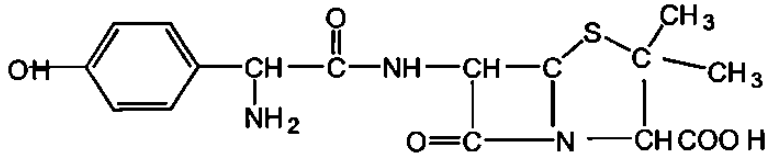

Figura 4. Estructura química de la amoxicilina

Fórmula molecular: $C_{16}H_{19}N_3O_5S$

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

Peso molecular: 365 g/mol

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

Clavulanato de Potasio

Su fórmula estructural es la siguiente:

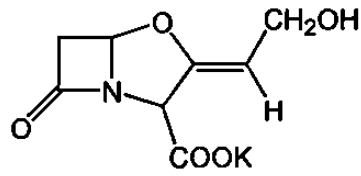

Figura 5 Estructura química del clavulanato de potasio

Fórmula molecular: $C_8H_9NO_5K$

Peso molecular: 238 g/mol

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

Espectro antimicrobiano:

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

Mecanismo de acción

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

Absorción, distribución y excreción:

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

Usos:

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

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

Actividad en contra de Nocardia

Se ha observado un incremento en la sensibilidad de *Nocardia* cuando los antibióticos β–lactámicos han sido probados en combinación con inhibidores de la β-lactamasa. Este efecto ha sido particularmente observado en la combinación amoxicilina-ácido clavulánico. La combinación amoxicilina-acido clavulánico ha sido utilizada en el tratamiento de algunos casos de infección cutánea por *Nocardia brasiliensis* (Gómez-Flores 2004). Además, también ha sido demostrada la actividad *in vivo* de esta combinación administrada en el tratamiento de ratones BALB/c con actinomicetoma. La combinación amoxicilina-ácido clavulánico presentó actividad *in vitro* en contra de aislados de *N. brasiliensis* con una MIC_{50} de 2 μg/mL y una MIC_{90} de 4 μg/mL (Gómez-Flores 2004).

1.3.3 Garenoxacina

La fórmula estructural de este antimicrobiano es la siguiente:

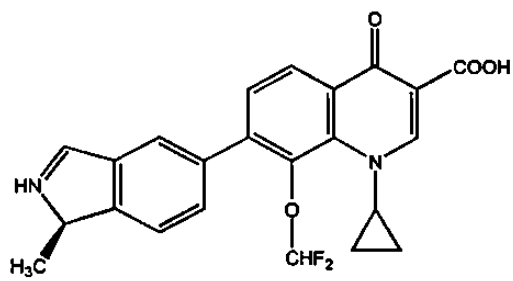

Figura 6. Estructura química de la garenoxacina.

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

Mecanismo de acción

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

Espectro antimicrobiano:

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

Absorción, distribución y excreción:

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

Usos

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

Actividad contra Nocardia brasiliensis

Vera-Cabrera y colaboradores probaron la actividad de tres quinolonas: moxifloxacina, garenoxacina y gatifloxacina. De éstas, la garenoxacina fue la más activa, con una MIC_{90} de 0.5 μg/mL (Vera-Cabrera 2004)

1.3.4 Linezolid

La fórmula estructural de este compuesto es la siguiente

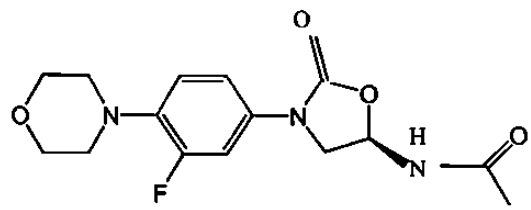

Figura 7. Estructura química del Linezolid.

Fórmula molecular: $C_{13}H_{15}N_3O_4F$

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

Peso molecular: 296 g/mol

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

Espectro antibacteriano:

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

Mecanismo de acción

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

.

Absorción, distribución y excreción:

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

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

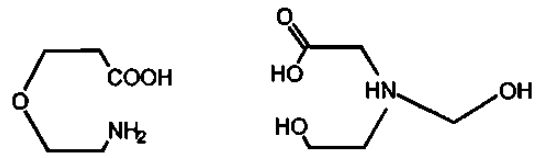

Figura 8. Principales metabolitos de Linezolid

Usos:

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

Actividad contra Nocardia

Linezolid presenta un gran actividad *in vitro* en contra de cepas de *N. brasiliensis* (Gómez-Flores 2004). También ha sido demostrada su actividad *in vivo* ya que al administrar linezolid a 15 ratones infectados con actinomicetoma, solo dos de ellos presentaron el desarrollo de lesiones francas durante el transcurso normal de la enfermedad (Gómez-Flores 2004). La actividad de Linezolid en contra de aislados de *N. brasiliensis* determinada por el método de microdilución en placa fue reportada con una MIC_{50} de 1 μg/mL y MIC_{90} de 2 μg/mL (Gómez-Flores 2004).

1.3.5 Trimetoprim-Sulfametoxazol

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

Sulfametoxazol

La fórmula estructural de este compuesto es la siguiente

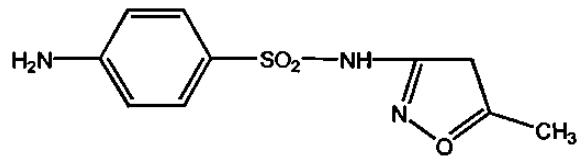

Figura 9. Estructura química del sulfametoxazol.

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

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

Peso molecular: 253 g/mol

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

Trimetoprim

La fórmula estructural de este compuesto es la siguiente

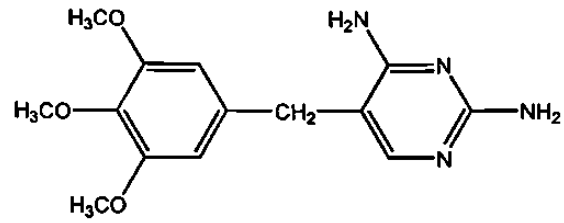

Figura 10. Estructura química del trimetoprim

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

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

Peso molecular. 290 g/mol

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

Espectro antibacteriano:

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

Mecanismo de acción

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

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

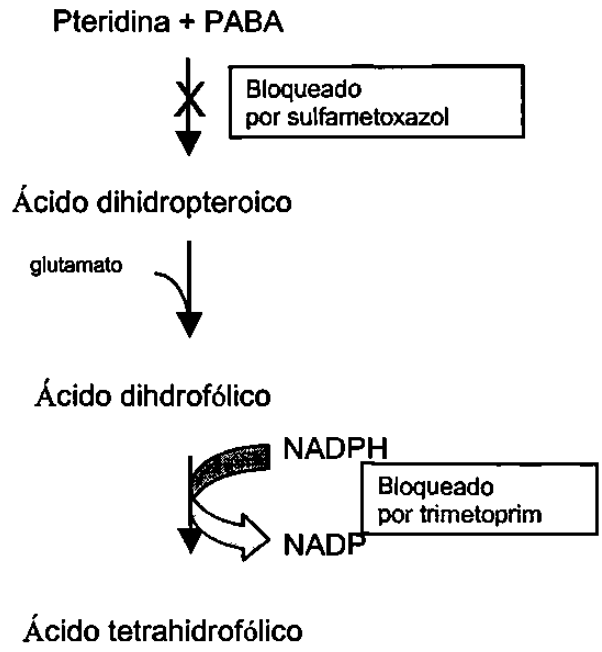

Figura 11. Etapas en el metabolismo de folato bloqueadas por sulfonamidas y trimetoprim

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

Absorción, distribución y excreción:

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

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

Cuando se administran 800 mg de sulfametoxazol con 160 mg de trimetoprim dos veces al día, las concentraciones máximas de ambos antimicrobianos en plasma alcanzan 40 y 2 μg/mL respectivamente.

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

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

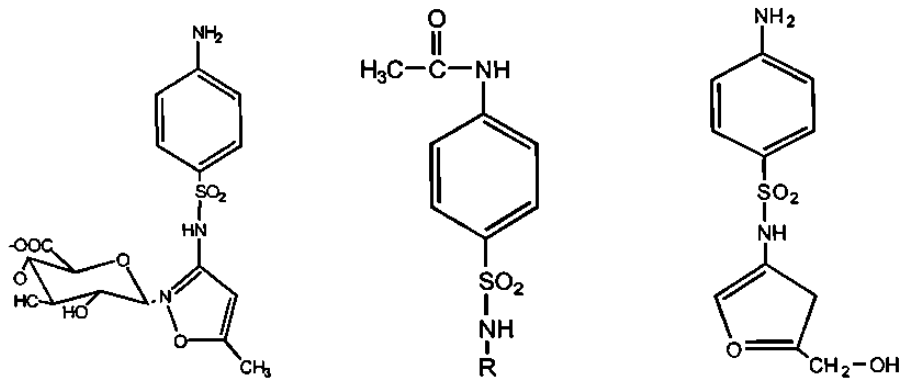

Figura 12. Metabolitos del sulfametoxazol

Usos:

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

Actividad contra Nocardia

La actividad de SXT en contra de aislados clínicos de *N. brasiliensis* determinada por el método de microdilución en placa es reportada por Gómez Flores con una MIC_{50}, en μg/mL, de 9.5/0.5 y MIC_{90} de 9.5/0.05 (Gómez-Flores 2004).

1.4 Antecedentes

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

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

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

1.4.1 Métodos analíticos para la determinación de antimicrobianos

1.4.1.1 Métodos para la determinación de amikacina

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

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

Debido a la naturaleza polar e iónica de estos compuestos, la separación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución empleando fase reversa se debe llevar a cabo utilizando buffer de acetato; el ión acetato actúa como contraión formando par iónico con el aminoglicósido (Isoherranen 1999). Por otro lado, ya que estos compuestos carecen de grupo cromóforo, deben ser derivatizados antes de la detección. De acuerdo al estudio de Isoherranen, los agentes derivatizantes más empleados para el caso de la amikacina han sido el ortoftaldehído/2 mercaptoetanol (OPA/2ME), el fluoro 2,4 dinitrobenceno (FDNB), el dinitrobencilcloruro (DNBC), el ácido 2,4,6 trinitrobencensulfónico (TNBS). Las columnas de separación empleadas han sido fase inversa C_8 o C_{18} y las fases móviles constituídas por mezclas de buffers ácidos con metanol y acetonitrilo (Isoherranen 1999, Maitra 1978, Sánchez-Martínez 2004).

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

1.4.1.2 Métodos para la determinación de Amoxicilina-Ácido Clavulánico

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

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

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

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

1.4.1.3 Métodos para la determinación de Linezolid

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

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

1.4.1.4 Métodos para la determinación de Garenoxacina

Para este antimicrobiano se han descrito determinaciones con la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Estas determinaciones se han llevado a cabo en suero de ratón (Xuan 2001) y en plasma de ratas, perros y monos (Hayakawa 2003). Xuan y colaboradores llevaron a cabo la determinación de garenoxacina por cromatografía de par iónico en una columna Nucleosil 100 C_{18} con una fase móvil compuesta por acetonitrilo-buffer de fosfatos 0.01 M con 0.01 M de fosfato de tetrabutilamonio como reactivo de par iónico. La detección se realizó por fluorescencia a una λ de excitación de 290 nm y una λ de emisión de 418 nm y se trabajó en un intervalo de 0.2 a 10 μg/mL. Hayakawa y colaboradores utilizaron una columna también de fase inversa y como fase móvil acetonitrilo con buffer de citrato 0.2 M a un pH de 3.5 y una detección por UV a 280 nm (λ de máxima absorción para el antimicrobiano). El intervalo de trabajo fue de 0.03 a 10 μg/mL.

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

1.4.1.5 Métodos para la determinación de sulfametoxazol-trimetoprim

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

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

1.4.2 Tratamiento previo de la muestra

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

1.4.2.1 Desproteinización.

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

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

1.4.2.2 Extracción en fase sólida

Este método consiste en una extracción líquido-sólido a través de una columna o cartucho de plástico el cual está relleno con materiales similares a los empleados para el relleno de las columnas de cromatografía. Estos rellenos pueden ser adsorbentes muy polares, como la sílica, hasta muy poco polares como los C_{18}. También pueden ser materiales de intercambio iónico o polímeros. Las sustacias neutras, no polares, se retienen de vehículos polares en columnas no polares tipo C_8 y C_{18}, estas columnas se lavan con mezclas de agua:solvente orgánico y los analitos se eluyen con algún solvente orgánico. Para análisis en suero o plasma de algunos antibióticos o compuestos activos, los cartuchos que se han utilizado son C_8 y C_{18} (Quattrocchi 1992).

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

1.4.2.3 Análisis de antimicrobianos en fluidos biológicos

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

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

Por otro lado, en otros reportes de determinación de linezolid y de amoxicilina, se ha empleado la extracción en fase sólida, con cartuchos de extracción de fase inversa C_{18}, cartuchos C_2 (Gee, 2001, Peng, 1999, Yuan, 1995) C8 (Lee, 1984, Krawinel, 1993). En todos los casos se reportan porcentajes de recuperación entre 95 y 100% con coeficientes de variación de los métodos inferiores al 15%.

1.4.2.4 Análisis de antimicrobianos en Tejido (músculo)

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

1.5 Justificación

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

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

1.6 Objetivo General

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

1.7 Objetivos Específicos

1.- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación simultánea de los antimicrobianos sulfametoxazol-trimetoprim, amoxicilina-ácido clavulánico linezolid, garenoxacina y amikacina

2.- Desarrollar la metodología para la extracción de estos agentes de plasma de ratón y tejido de ratón infectado con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

3.- Validar los métodos analíticos desarrollados en ambas matrices

4.- Verificar la utilidad de los métodos desarrollados aplicándolos en la cuantificación de estos agentes en muestras de plasma y tejido infectado de ratones infectados con actinomicetoma y tratados con los antimicrobianos anteriormente descritos

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipos

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

2.2 Materiales

- Columna Hypersil ODS (100 x 2.1 mm DI, 5 μm de tamaño de partícula) Agilent
- Columna X-Terra RP C_{18} (100 x 2.1 mm DI, 5 μm de tamaño de partícula) Waters
- Columna Atlantis dC_{18} (150 x 4.6 mm DI, 5 μm de tamaño de partícula) Waters
- Guardacolumna Symetry C_{18} Waters
- Tubos eppendorf 1.5 mL
- Tubos cónicos de 5 y 10 mL
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Matraces de aforación de 10 mL
- Pipetas automáticas de 10 a 100 μL y de 100 a 1000 μL Brand
- Puntillas
- Guantes para cirujano # 7
- Jeringas desechables de 5 mL
- Filtros de Nylon 0.45 μm y diámetro de 13 mm Waters
- Filtros para HPLC de nylon para solventes (13 x 47 mm, 0.45 μm) y para muestras (acrodiscos de Nylon de 0.45 μm) Waters Corporation
- Insertos de capacidad de 150 μL Waters Corporation
- Viales para cromatógrafo Waters Corporation

2.3 Reactivos

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

2.4 Métodos

2.4.1 Preparación de soluciones

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

2.4.1.1 Reactivos

Buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.2

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

Buffer de fosfatos 0.01 M pH 4

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

Ácido Trifluoroacético 0.1 %

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

Trietilamina 0.3% pH 4

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

Buffer de boratos.

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

Reactivo de derivatización

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

2.4.1.2 Estándares

Estándares individuales de antimicrobianos

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

Mezcla de antimicrobianos

Se prepararon mezclas de los antimicrobianos a 3 diferentes concentraciones: 100, 10 y 1 μg/mL.

Mezcla 1: 100 μg/mL

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

Mezcla 2: 10 μg/mL

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

Mezcla 3: 1 μg/mL

Se tomaron 10 μl de cada estándar y se colocaron en un matraz de aforación de 10 mL. Se llevó a la marca utilizando buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.2. La concentración de esta mezcla fue de 1 μg/mL.

2.4.2 Condiciones cromatográficas

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

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

TABLA V

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PROBADAS DURANTE EL DESARROLLO DEL MÉTODO

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

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

2.4.3 Optimización del sistema

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

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

TABLA VI

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

Programa 1

Tiempo minutos	% ATF*	% AC
1	87	13
4	87	13
10	78	22
16	78	22
17	75	25
21	75	25
22	87	13
24	87	13

Programa 2

Tiempo minutos	% ATF*	% ACN
4	90	10
14	77	23
24	77	23
26	90	10
29	90	10

Programa 3

Tiempo minutos	% ATF*	% ACN
1	92	8
4	92	8
14	77	23
24	77	23
26	92	8
30	92	8

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

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

a) Factor de selectividad

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

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

donde

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

t_0 es el tiempo muerto

b) Factor de capacidad

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

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o} \qquad \text{(ecuación 2)}$$

donde

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

c) Resolución

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

$$R = \frac{2\left[t_{R2} - t_{R1} \right]}{w_2 + w_1} \qquad \text{(ecuación 3)}$$

donde

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

w_1 y w_2 representan el ancho del pico en su base, en minutos, de los compuestos 1 y 2 respectivamente

d) Número de platos teóricos

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

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

A mayor número de platos teóricos es mayor la eficiencia

2.4.4 Validación del sistema cromatográfico

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

2.4.4.1 Linealidad

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

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

donde:

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

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

El coeficiente de variación se calculó como

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

donde

$\overline{X}$ representa la media de las mediciones

ds es la desviación estándar obtenida de estas tres mediciones

2.4.4.2 Límite de detección

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

$$LD = \frac{3.3ds}{m} \qquad \text{(ecuación 7)}$$

donde:

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

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

2.4.5.3 Límite de cuantificación

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

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

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

donde:

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

m es la pendiente de la curva de calibración (Euripean Agency1996)

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

2.4.4.4 Precisión Intradía e Interdía

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

2.4.4.5 Robustez

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

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

TABLA VII

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR ROBUSTEZ.

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

* el experimento 0 corresponde al método optimizado

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

$$V_A = ¼ (s+t+u+v) - ¼ (w+x+y+z)$$
$$V_B = ¼(s+t+w+x)- ¼ (u+v+y+z)$$
$$V_C = ¼ (s+u+w+y) - ¼ (t+w+x+z)$$
$$V_D = ¼ (s+t+y+z) - ¼ (u+v+w+x)$$
$$V_E = ¼ (s+u+x+z) - ¼ (t+v+w+y)$$
$$V_F = ¼ (s+v+w+z) - ¼ (t+u+x+y)$$
$$V_G = ¼ (s+v+x+y) - ¼ (t+u+w+z)$$

Los resultados fueron evaluados empleando la siguiente ecuación:

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

donde:

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

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

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

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

2.4.4.6 Estabilidad de la mezcla

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

2.4.5 Métodos de tratamiento de muestra

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

2.4.5.1 Elección del solvente de desproteinización

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

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

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

2.4.5.2 Elección del volumen del plasma

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

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

(ecuación 10)

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

2.4.6 Desarrollo del método

2.4.6.1 Plasma

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

2.4.6.2 Tejido de ratón infectado con actinomicetoma

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