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

2.4.7 Validación del método

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

2.4.7.1 Linealidad

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

Plasma

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

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

Tejido

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

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

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

2.4.7.2 Límite de detección

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

2.4.7.3 Límite de cuantificación

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

2.4.7.4 Precisión intradía e interdía

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

2.4.7.5 Exactitud

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

Plasma

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

Tejido infectado de ratón

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

2.4.7.6 Selectividad

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

2.4.7.7 Estabilidad

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

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

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

Reacción de ortoftaldehído.

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

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

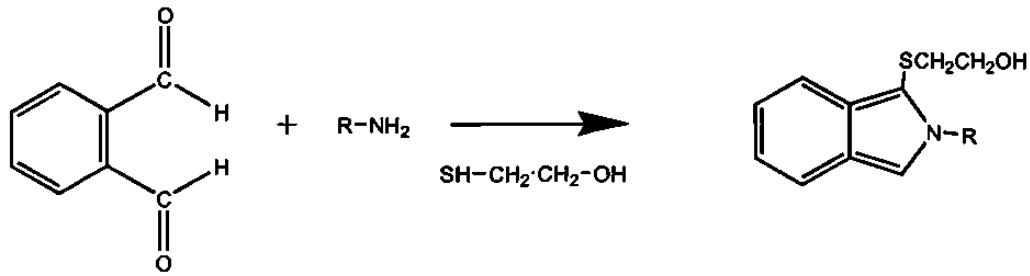


Figura 13. Reacción de OPA/2ME con grupo amino

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

2.4.9 Aplicabilidad

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

2.4.9.1 Plasma

Se realizaron determinaciones en plasma de los antimicrobianos linezolid y garenoxacina. Las muestras fueron congeladas a –20 °C hasta su procesamiento. Se descongelaron hasta alcanzar temperatura ambiente. Se tomaron 50 µL de plasma y se sometieron al método de procesamiento anteriormente descrito.

2.4.9.2 Tejido

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

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

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

3

RESULTADOS

3.1 Sistema cromatográfico

De los 5 sistemas cromatográficos probados durante el desarrollo del método las mejores condiciones cromatográficas para la separación de amoxicilina (AMX), trimetoprim (TMP), sulfametoxazol (SMX), linezolid (LZ) y garenoxacina (GR) se obtuvieron utilizando una columna Waters Atlantis dC_{18} (150 x 4.6 mm y 5 μm de tamaño de partícula), a una temperatura de 30 °C y a un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó con un programa de gradiente utilizando una fase móvil compuesta de: solvente A ácido trifluoroacético al 0.1 % y solvente B acetonitrilo.

3.1.1 Optimización del sistema

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

TABLA VIII

PARÁMETROS DE EFICIENCIA OBTENIDOS DURANTE LA OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

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

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

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

La figura 15 muestra el cromatograma con detección por fluorescencia.

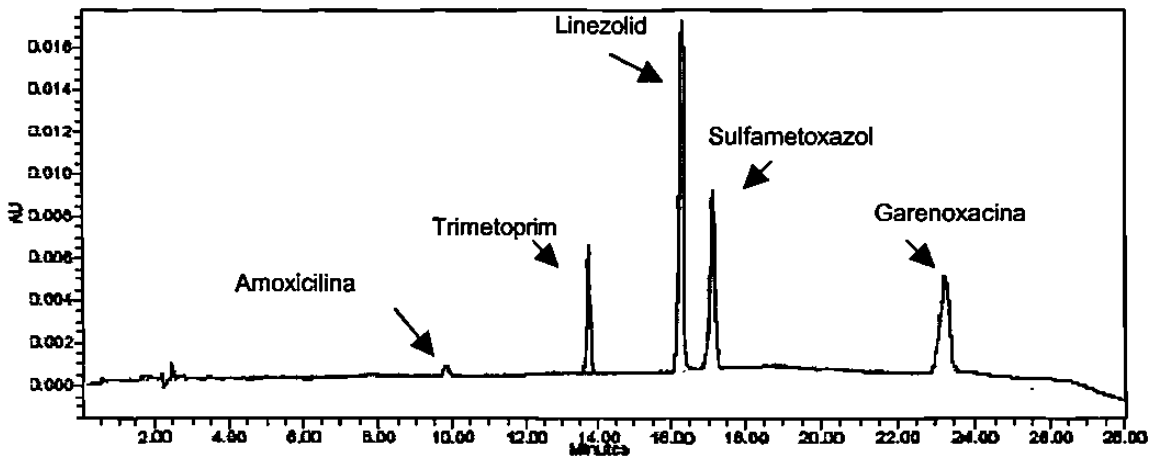


Figura 14. Cromatograma de la mezcla estándar de antimicrobianos a 5 µg/mL. 1) amoxicilina 2) trimetoprim 3) linezolid 4) sulfametoxazol 5) garenoxacina. Fase estacionaria: Columna AtlantisC_{18} Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo elución en gradiente. Detección UV 254 nm.

TABLA IX

PROGRAMA DE ELUCIÓN PARA LA SEPARACIÓN DE ANTIMICROBIANOS

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

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

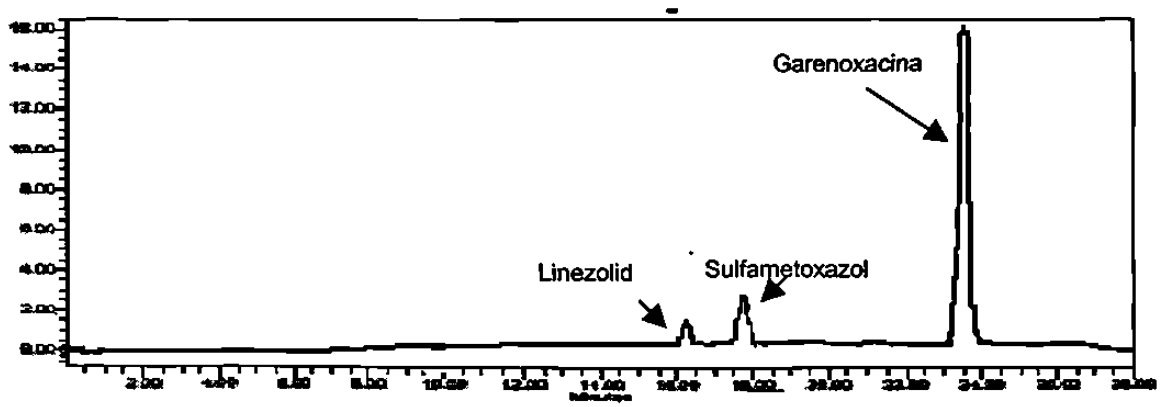


Figura 15. Cromatograma de la mezcla estándar de antimicrobianos a 5 μg/mL. 1) linezolid 2) sulfametoxazol 3) garenoxacina. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC_{18} Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo Elución en gradiente. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392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

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

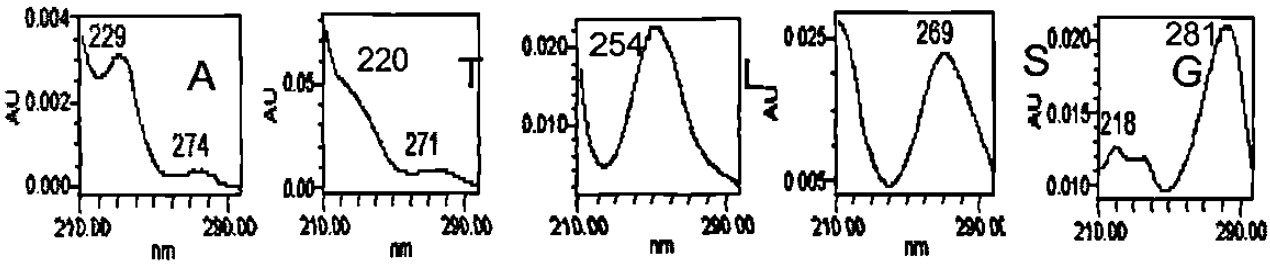


Figura 16. Espectros de absorción de A:amoxicilina, T:trimetoprim, L:linezolid S:sulfametoxazol G:garenoxacina. Los máximos da absorción son: amoxicilina 229 nm, trimetoprim 220 nm, linezolid 254 nm, sulfametoxazol 269 nm y garenoxacina 281 nm. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna Atlantis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

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

3.1.2.1 Intervalo lineal

El intervalo lineal para amoxicilina fue de 1.2-20 μg/mL. Para Trimetoprim de 0.15 a 20 μg/mL, sulfametoxazol y linezolid fue de 0.15-40 μg/mL y para garenoxacina fue de 0.3 a 10 μg/mL.

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

TABLA X

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

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

*Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Los datos son el promedio de tres determinaciones. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm

3.1.2.2 Límites de detección y límites de cuantificación

En la tabla XI se muestran los límites de detección y de cuantificación obtenidos para cada antimicrobiano. Los límites fueron establecidos de acuerdo a las

guías de validación de la FDA, y por cálculo tomando en cuenta la señal del blanco (European Agency, Miller 2003).

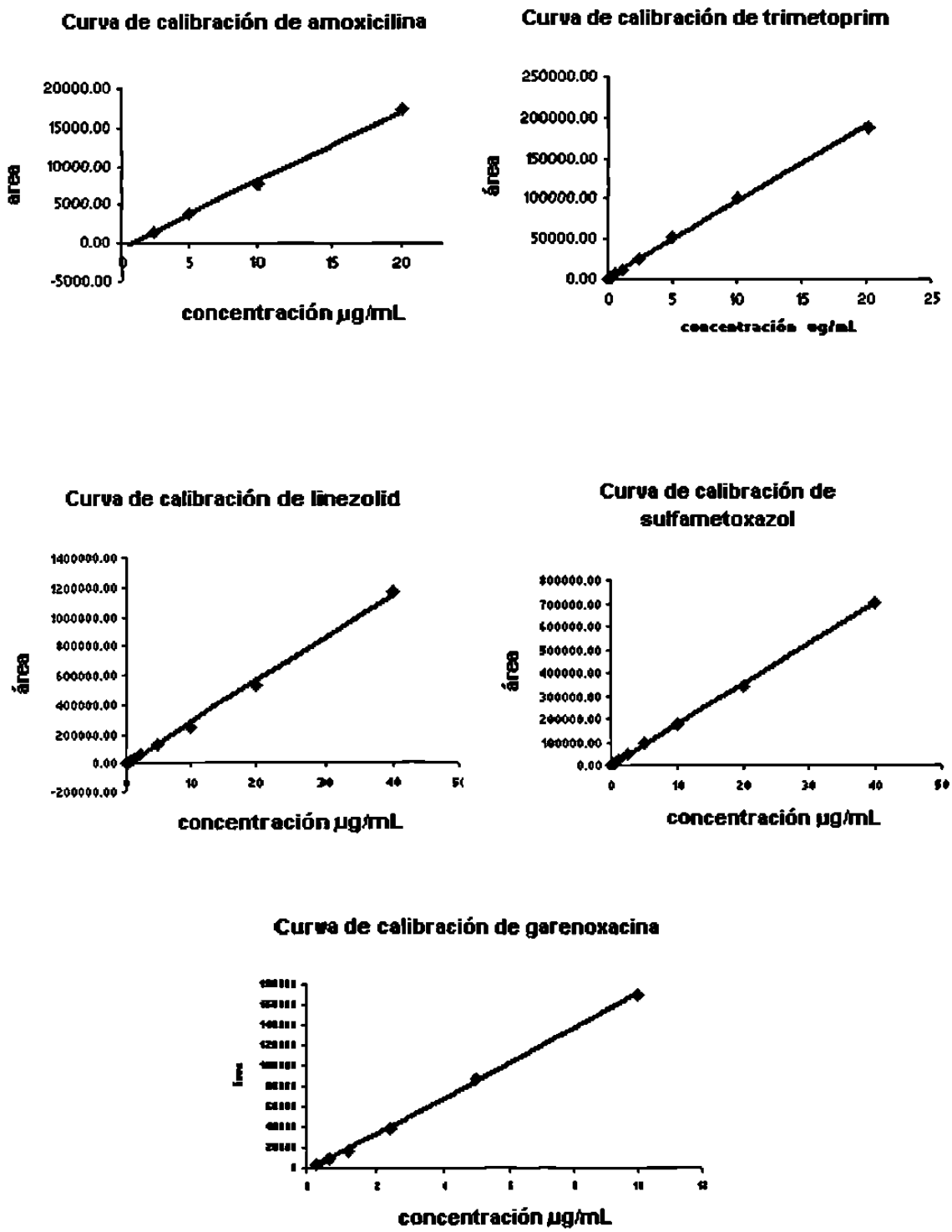


Figura 17. Curvas de calibración obtenidas para los antimicrobianos. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC18. Fase móvil ATF 0.1%: Acetonitrilo. Flujo 1mL/min. Elución en gradiente. Detección UV 254 nm.

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

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

Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm

3.1.2.3 Precisión intradía e interdía

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

En la tabla XIII se muestran los coeficientes de variación del sistema, de análisis realizados en tres días diferentes, obtenidos para los antimicrobianos a tres

niveles de concentración: para amoxicilina los niveles fueron de 2.4, 5 y 10 μg/mL; para el resto de los antimicrobianos los niveles fueron 0.3, 5 y 10 μg/mL Los datos

TABLA XII

PRECISIÓN INTRADÍA DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

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

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm *El nivel bajo para amoxicilina es 2.4 μg/mL.

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

3.1.2.4 Robustez

El análisis de datos obtenidos a partir del diseño experimental se muestra en la tabla XIV. En la parte superior se muestra el valor de la desviación estándar obtenido del análisis de precisión para cada antimicrobiano. Se obtuvieron los tiempos de retención de cada antimicrobiano a partir del cromatograma obtenido para cada una de las modificaciones propuestas de acuerdo al diseño experimental. Los valores de las medias de las diferencias se muestran en cada

recuadro. Cada uno de estos valores fue comparado con la desviación estándar y, al ser mayores que ésta, puede afirmarse que la modificación de todos los parámetros afecta significativamente al método. Excepto en el caso de la garenoxacina, en el cambio de proporción inicial de acetonitrilo, todas las medias resultaron mayores que las desviaciones estándar, por lo que el cambio en cualquiera de las condiciones probadas afecta significativamente al método.

TABLA XIII

PRECISIÓN INTERDÍA DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

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

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisdC18, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm *El nivel bajo para amoxicilina es 2.4 μg/mL.

3.1.2.5 Estabilidad

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

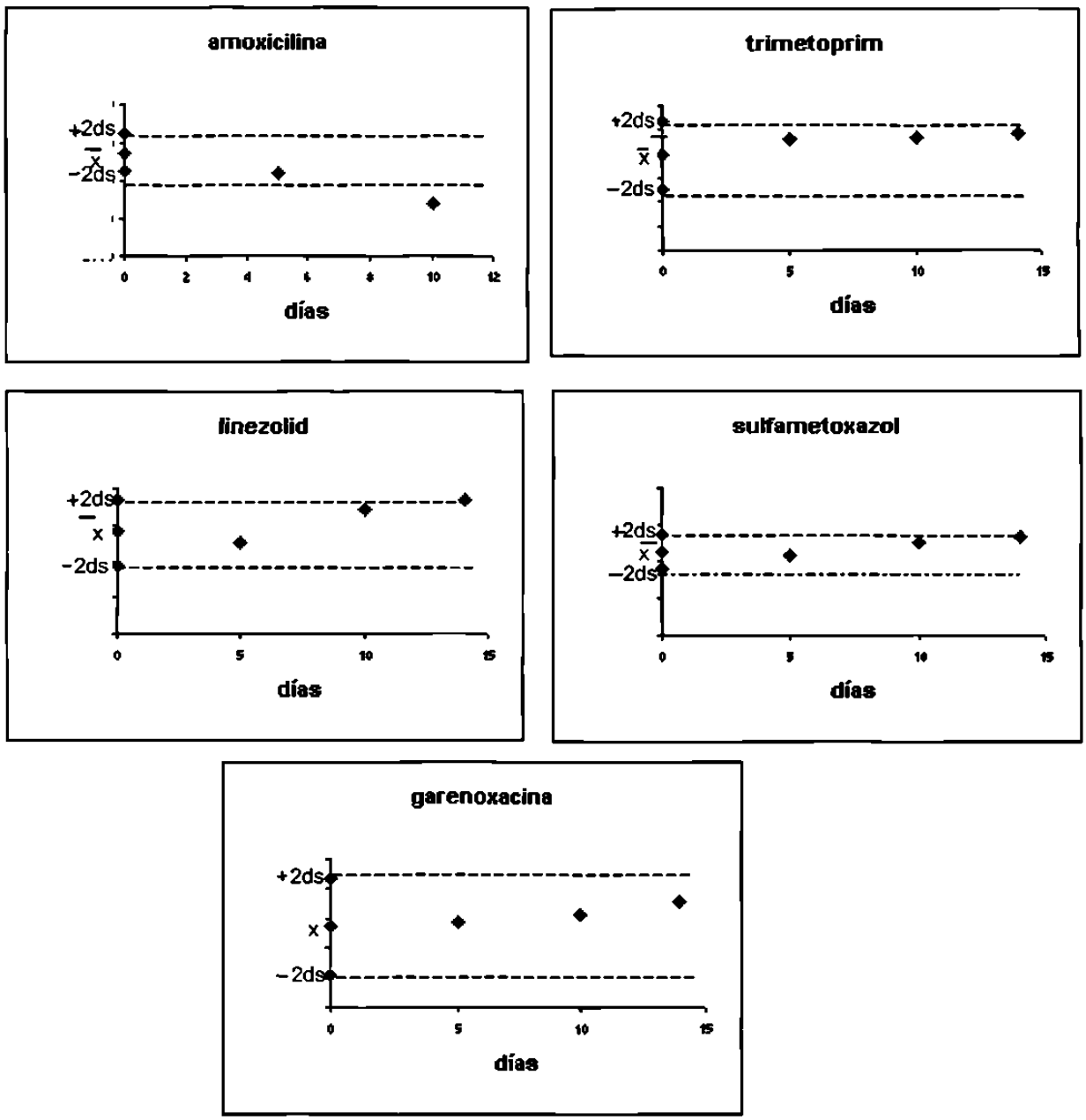


Figura 18. Gráficas de estabilidad de antimicrobianos en la mezcla estándar. La mezcla fue preparada en buffer de fosfatos 0.01M pH 7.2 M

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

3.1.3.1 Intervalo lineal

La tabla XV muestra los datos de validación obtenidos para el intervalo lineal de trabajo: Factor de respuesta promedio para cada analito, coeficiente de variación de los factores de respuesta (RSD), la ecuación de regresión con los valores de la pendiente (m), y el intercepto (b), así como el coeficiente de correlación (R^2). La figura 19 muestra las curvas de calibración obtenidas para cada antimicrobiano.

TABLA XIV

RESULTADOS DEL ENSAYO DE ROBUSTEZ

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

TABLA XV

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

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

*Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Los datos son el promedio de tres determinaciones. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por

fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina.

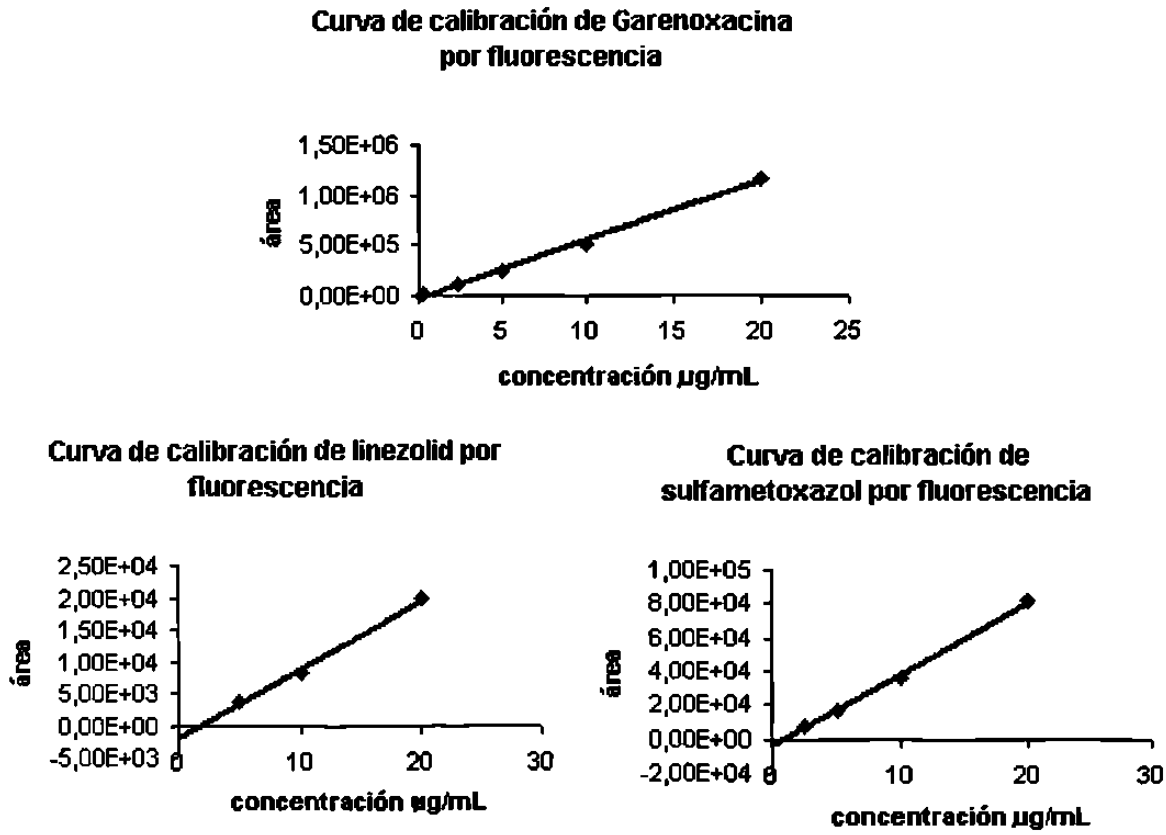


Figura 19. Curvas de calibración para garenoxacina, linezolid y sulfametoxazol. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC18 Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo elución en gradiente. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408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

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

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

3.1.3.3 Precisión por CLAR-Fluorescencia

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

TABLA XVI

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTIMICROBIANOS CLAR-FLUORESCENCIA

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

Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina.

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

TABLA XVII

PRECISIÓN INTRADÍA DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

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

Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisdC$_{18}$, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina.

3.1.3.4 Robustez

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

TABLA XVII

PRECISIÓN INTERDÍA DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

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

Las determinaciones se realizaron por quintuplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisdC18, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 282/392 nm para sulfametoxazol y linezolid y de 292/408 para garenoxacina

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

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

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

ANÁLISIS DE AMIKACINA CON OPA/ 2ME
a) solución estándar b) en plasma

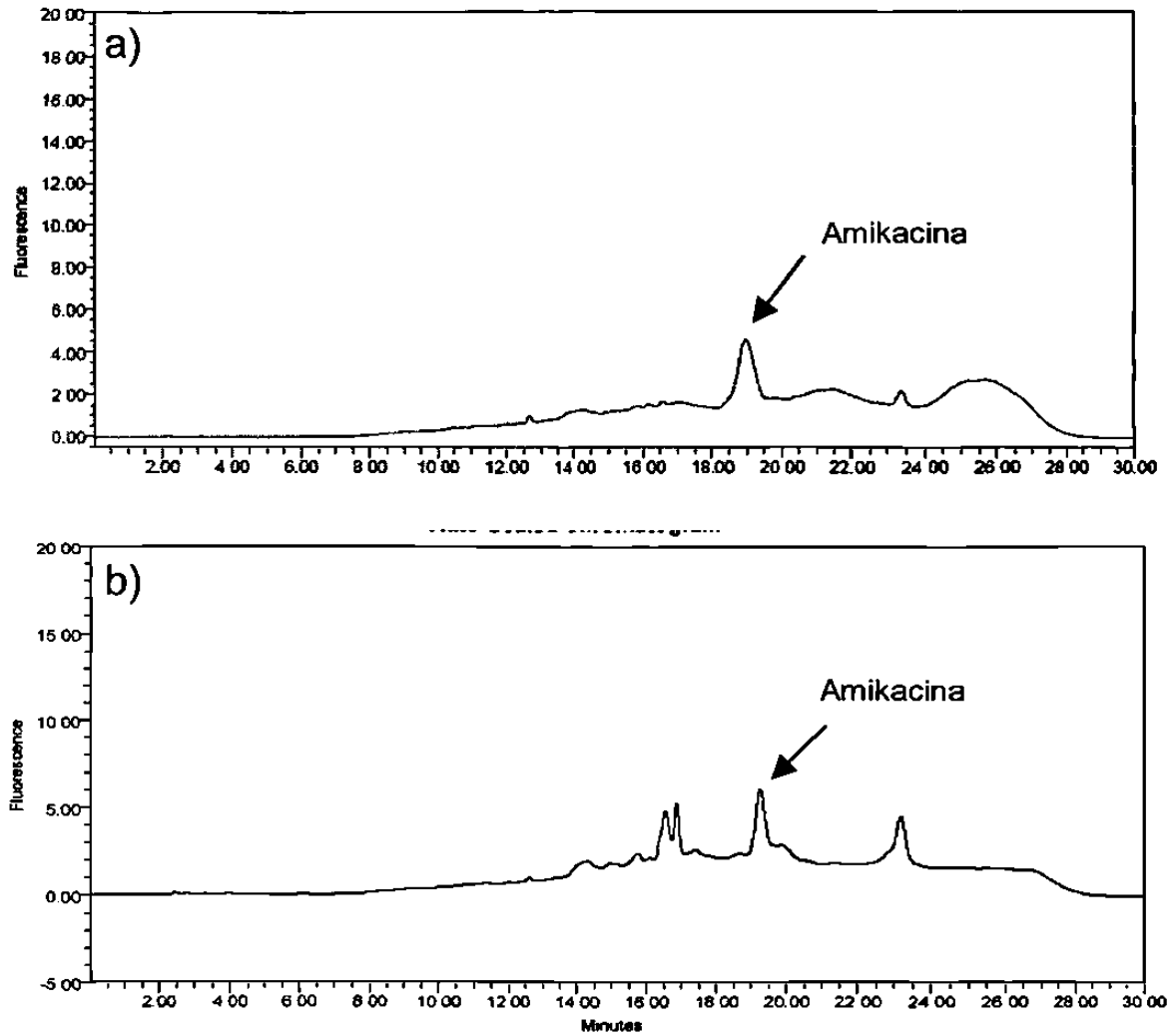


Figura 20 a) Cromatograma de amikacina 100 μg/mL derivatizada con OPA/ 2ME b) Cromatograma de amikacina 100 μg/mL en plasma derivatizada con OPA/ 2ME .Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisdC18, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 365/465 nm. La flecha indica la señal de la amikacina

3.2 Métodos analíticos desarrollados en plasma y tejido

3.2.1 Tratamiento de la muestra

3.2.1.1 Elección del solvente para precipitar proteínas

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

TABLA XVIII

RESULTADOS DE RECUPERACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES PRECIPITANTES

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

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

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

3.2.1.2 Volumen de muestra

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

TABLA XIX

ANÁLISIS DE VARIANZA

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

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

TABLA XX

PRUEBA F

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

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

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

En la figura 21 se muestra un cromatograma de plasma de ratón adicionado con la mezcla de antimicrobianos a concentración de 5 µg/mL

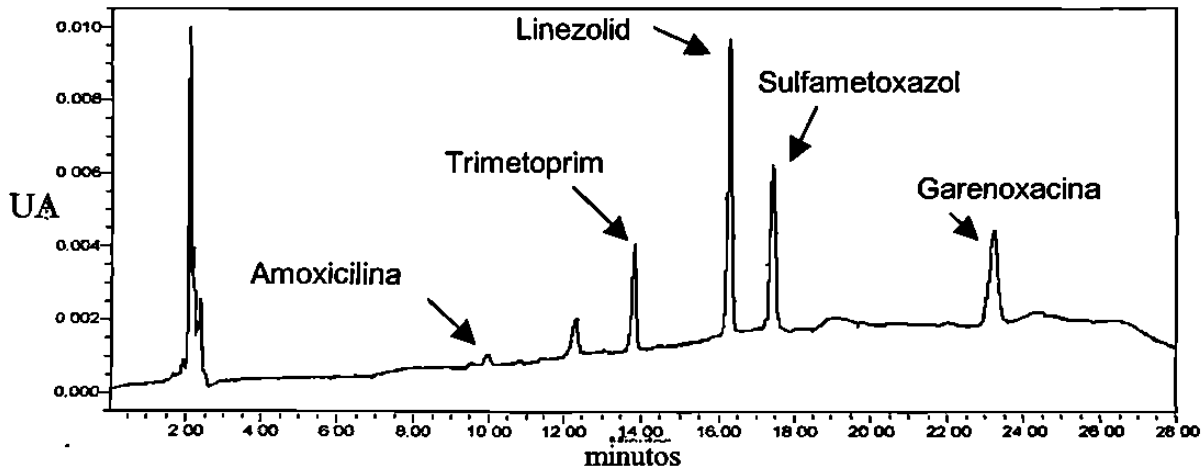


Figura 21. Cromatograma de la mezcla de estándares a 5 µg/mL en plasma de ratón. Columna Atlantis dC_{18} 5µm (150 x 4.6 mm), Fase móvil TFA 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30 °C. Detección 254 nm.

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

3.2.2.1 Linealidad, límites de detección y de cuantificación

El intervalo lineal de trabajo para amoxicilina fue de 2.4 a 20 μg/mL. Para trimetoprim, sulfametoxazol y linezolid fue de 0.3 a 20 μg/mL y para garenoxacina fue de 0.3 a 10 μg/mL.

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

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

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

TABLA XXI

INTERVALO LINEAL Y ECUACIONES DE REGRESIÓN OBTENIDAS PARA ANTIMICROBIANOS EN PLASMA

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

*Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Los datos son el promedio de tres determinaciones. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm

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

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

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

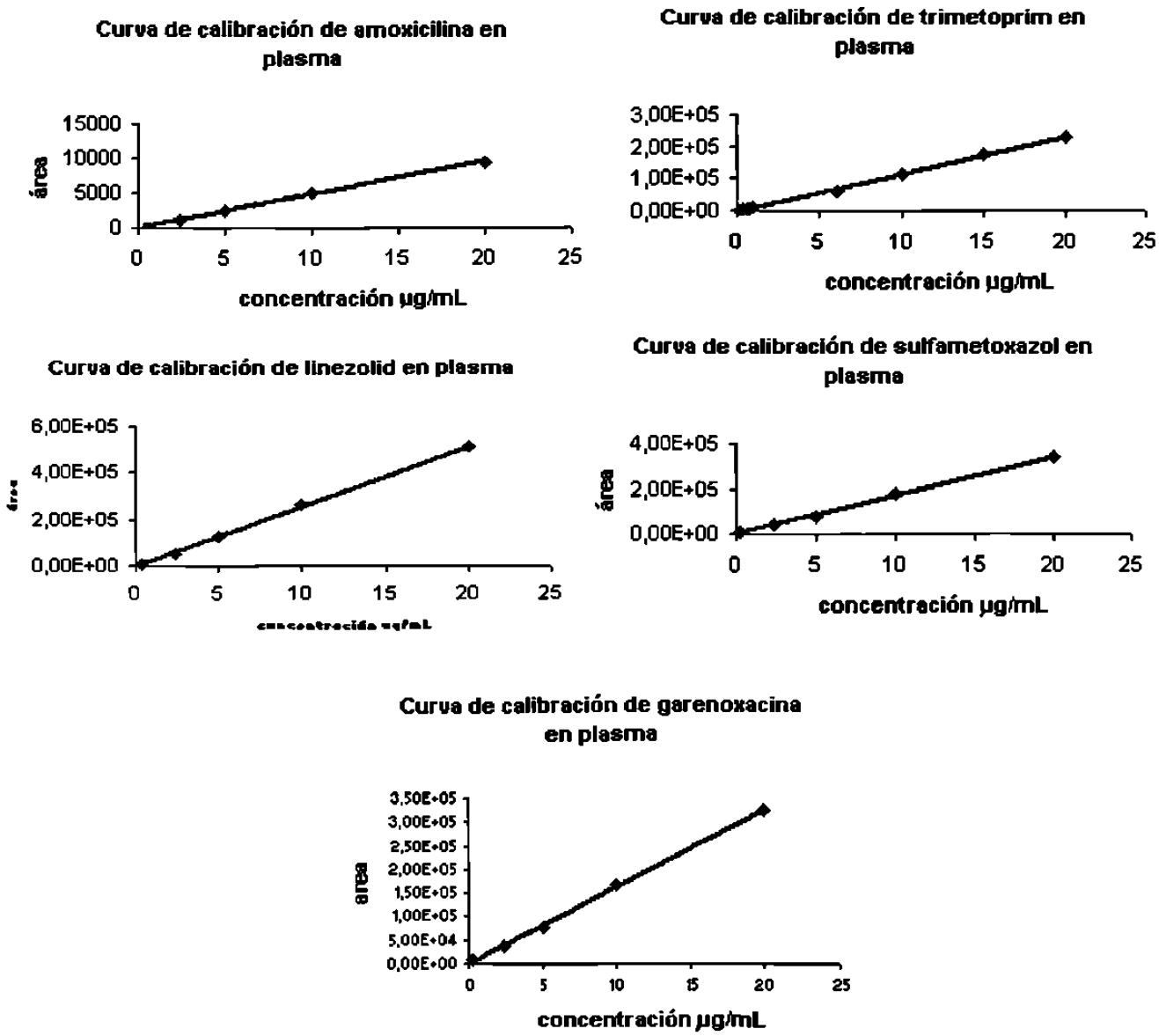


Figura 22. Curvas de calibración obtenidas para los antimicrobianos. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC18. Fase móvil ATF 0.1%: Acetonitrilo. Flujo 1mL/min. Elución en gradiente. Detección UV 254

3.2.2.2 Precisión intradía e interdía

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

TABLA XXIII

DETERMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLASMA PRECISIÓN INTRADIA A TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN

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

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%: Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por UV 254 nm * Valor determinado a concentración de 2.4 µg/mL

TABLA XXIV

DETERMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLASMA PRECISIÓN INTERDIA A TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN

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

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por UV 254 nm. * Valor determinado a concentración de 2.4 µg/mL

3.2.2.3 Exactitud

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

TABLA XXV

DETERMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLASMA RECUPERACIÓN A TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN

Antimicrobiano	**0.6μg/mL %R±ds**	**RSD**	**5 μg/mL %R±ds**	**RSD**	**10 μg/mL %R±ds**	**RSD**
Amoxicilina	ND	Nd	88±5	6	71±0.8	1
Trimetoprim	118 ±11	9	108±16	15	114±9	8
Linezolid	104±4	4	89±12	14	96±5	5
Sulfametoxazol	94±10	11	108±7	6	110±12	11
Garenoxacina	111±13	12	109±11	10	107±8	7

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

3.2.2.4 Selectividad

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

3.2.2.5 Estabilidad

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

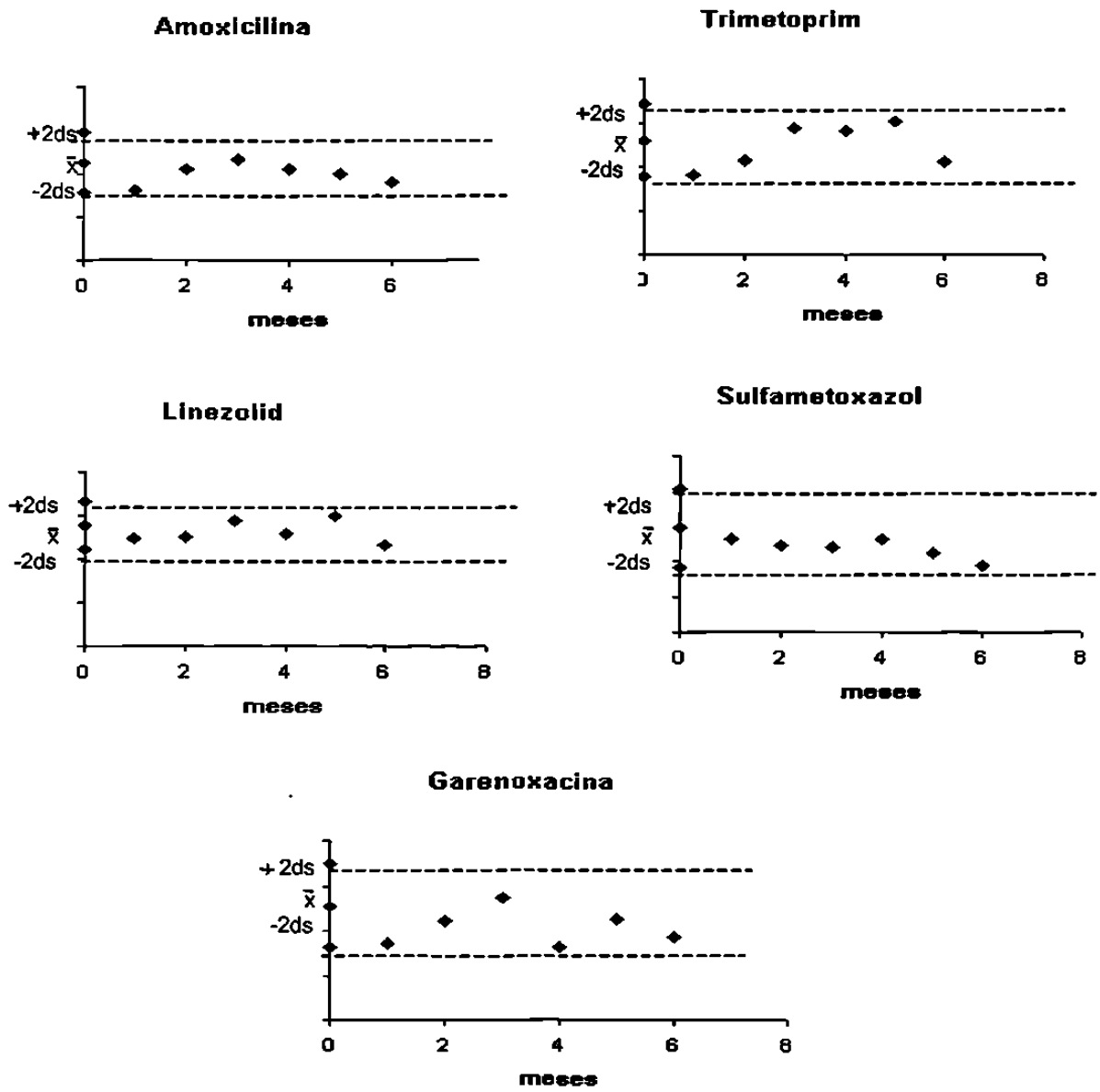


Figura 23 a). Gráficas control para establecer estabilidad de los antimicrobianos. Las muestras de plasma fueron almacenadas a –20°C.

notablemente disminuídas. De la misma manera, las muestras analizadas y guardadas en refrigeración por 24 horas también presentaron una disminución de la señal. (Figura 23 b)

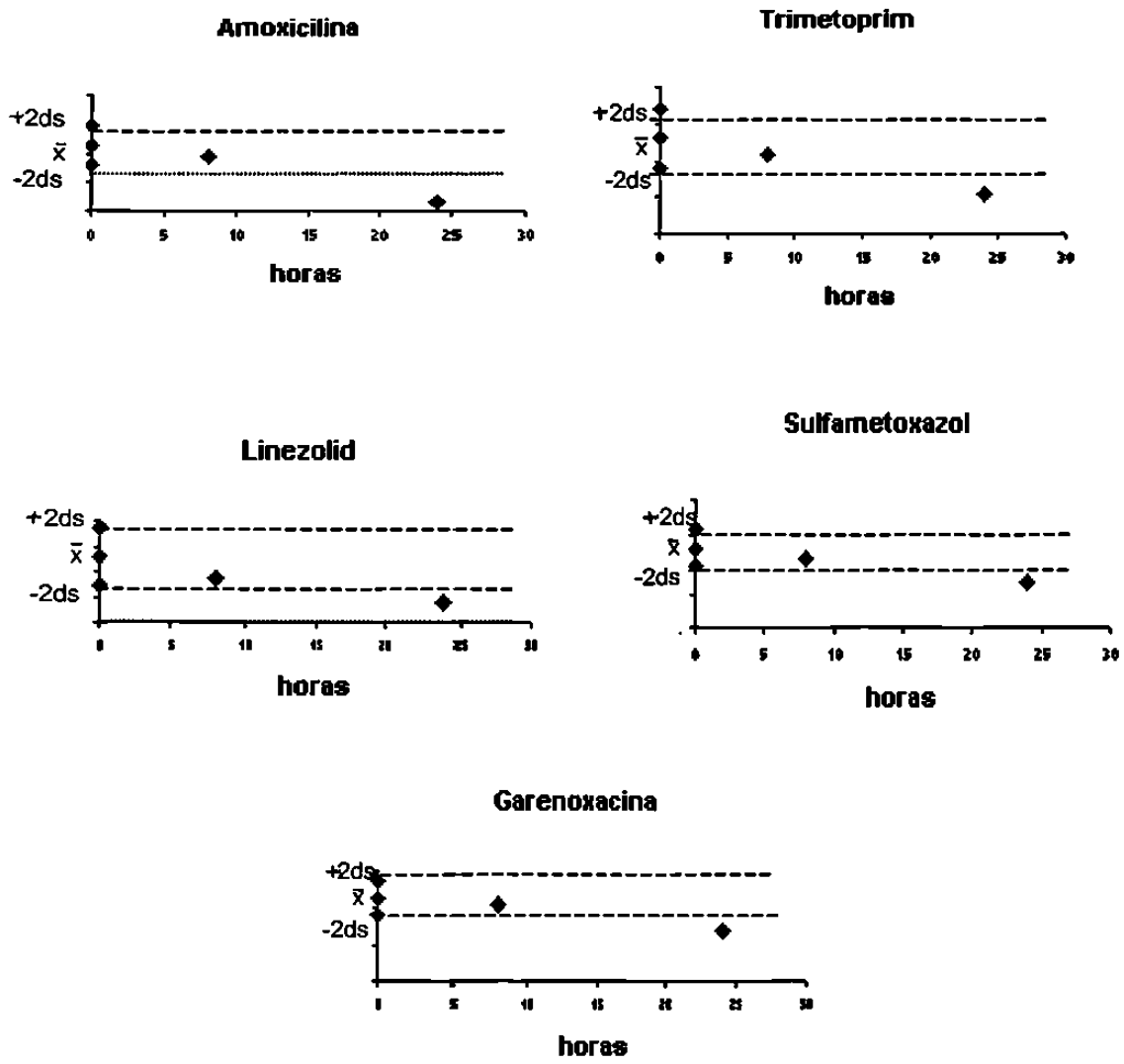


Figura 23 b). Gráficas control para aestablecer la estabilidad de los antimicrobianos en muestras de plasma preparadas.

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

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

3.2.3.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación

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

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

TABLA XXVI

INTERVALO LINEAL Y ECUACIÓN DE REGRESIÓN OBTENIDA PARA GARENOXACINA EN PLASMA

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

Datos calculados a partir de área de pico. Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por fluorescencia: longitudes de onda de excitación/emisión de 292/408.

3.2.3.2 Precisión

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

3.2.3.3 Exactitud

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

TABLA XXVII

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GARENOXACINA CLAR-Fluorescencia

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

Fase estacionaria: Columna AtlantisdC18, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C Detección por fluorescencia: longitud de onda de excitación/emisión de 292/408 nm. Los límites fueron calculados esperimentalmente de acuerdo a las guías de la FDA.

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

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

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

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

3.2.4.1 Linealidad, límites de detección y de cuantificación

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

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

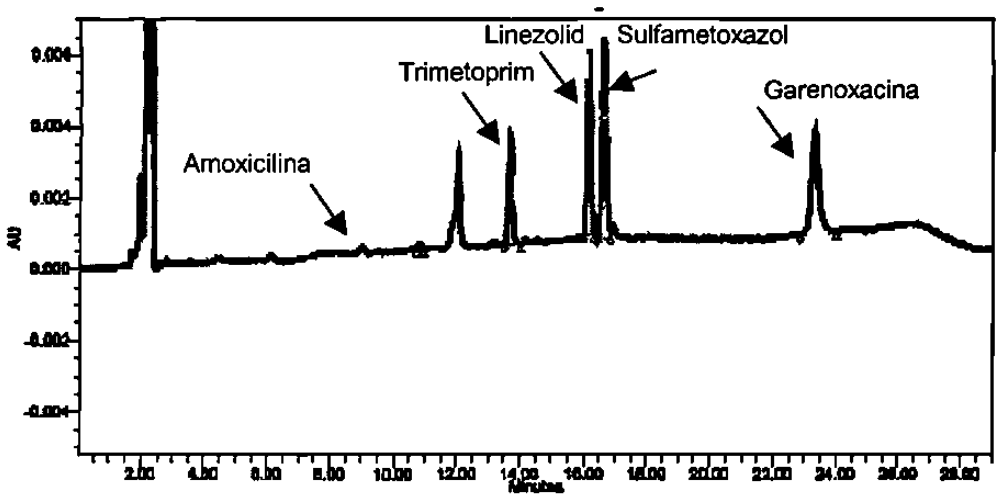


Figura 24. Cromatograma de la mezcla de estándares a 5 μg/mL en tejido de ratón. Columna Atlantis dC18 5μm (150 x 4.6 mm), Fase móvil TFA 0.1%Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30 °C. Detección 254 nm. Las señales cromatográficas corresponden a 1)Amoxicilina, 2) Trimetoprim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

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

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

TABLA XXVIII

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

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

*Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Los datos son el promedio de tres determinaciones. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30 °C. Detección a 254 nm

TABLA XXIX

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

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

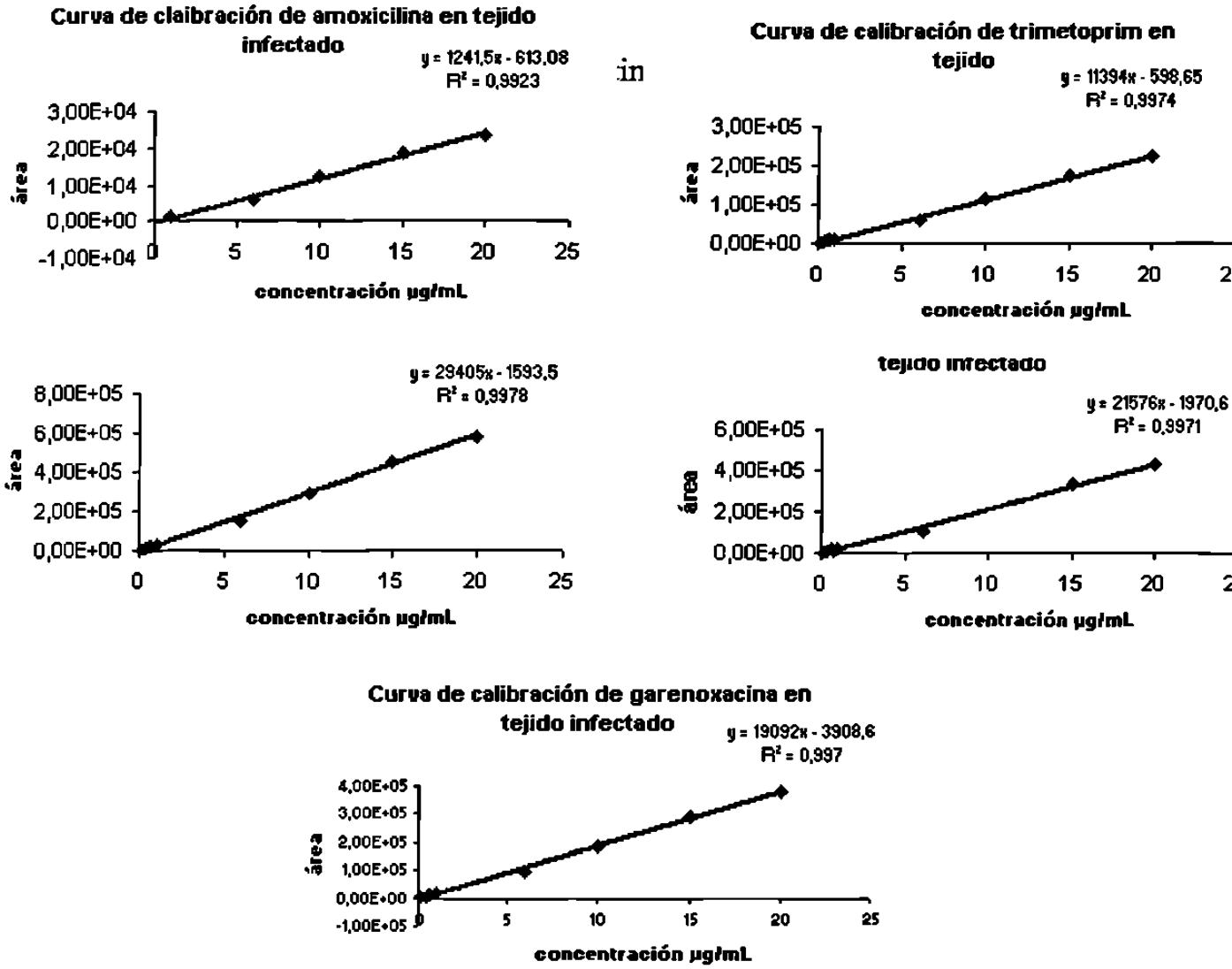


Figura 25. Curvas de calibración obtenidas para los antimicrobianos. Fase estacionaria: Columna Atlantis dC_{18}. Fase móvil ATF 0.1%:Aceonitrilo. Flujo 1mL/min. Elución en gradiente. Detección UV 254 nm.

3.2.4.2 Precisión

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

TABLA XXX

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

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

Fase estacionaria: Columna AtlantisdC_{18}, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección a 254 nm

3.2.4.3 Exactitud

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

3.2.4.4 Selectividad

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

TABLA XXXI

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

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

3.2.5 Aplicaciones

3.2.5.1 Aplicaciones en plasma

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

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

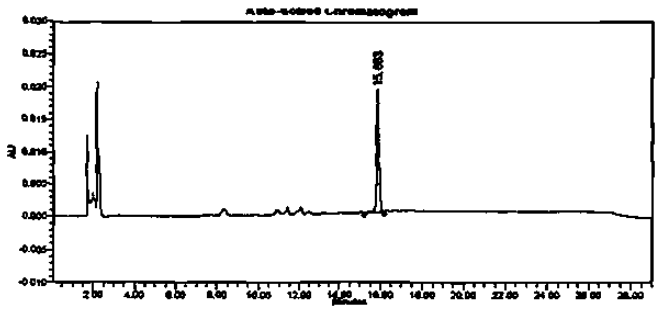
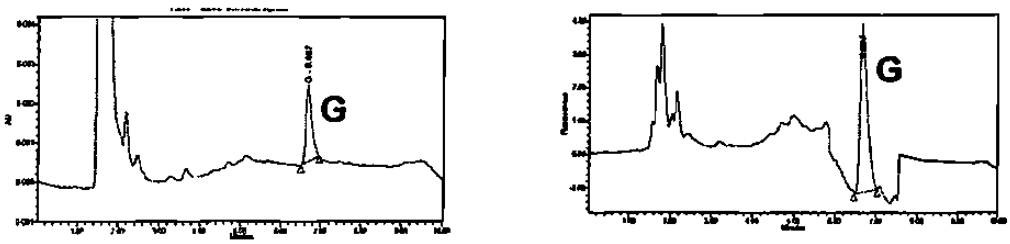


Figura 26. Análisis de linezolid en plasma de ratón. Condiciones de análisis: Fase estacionaria: Columna AtlantisdC18, Fase móvil: ATF 0.1%:Acetonitrilo. Elución en gradiente. Flujo 1mL/min. Temperatura 30°C. Detección por UV 254 nm.



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

3.2.5.2 Aplicaciones en tejido

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

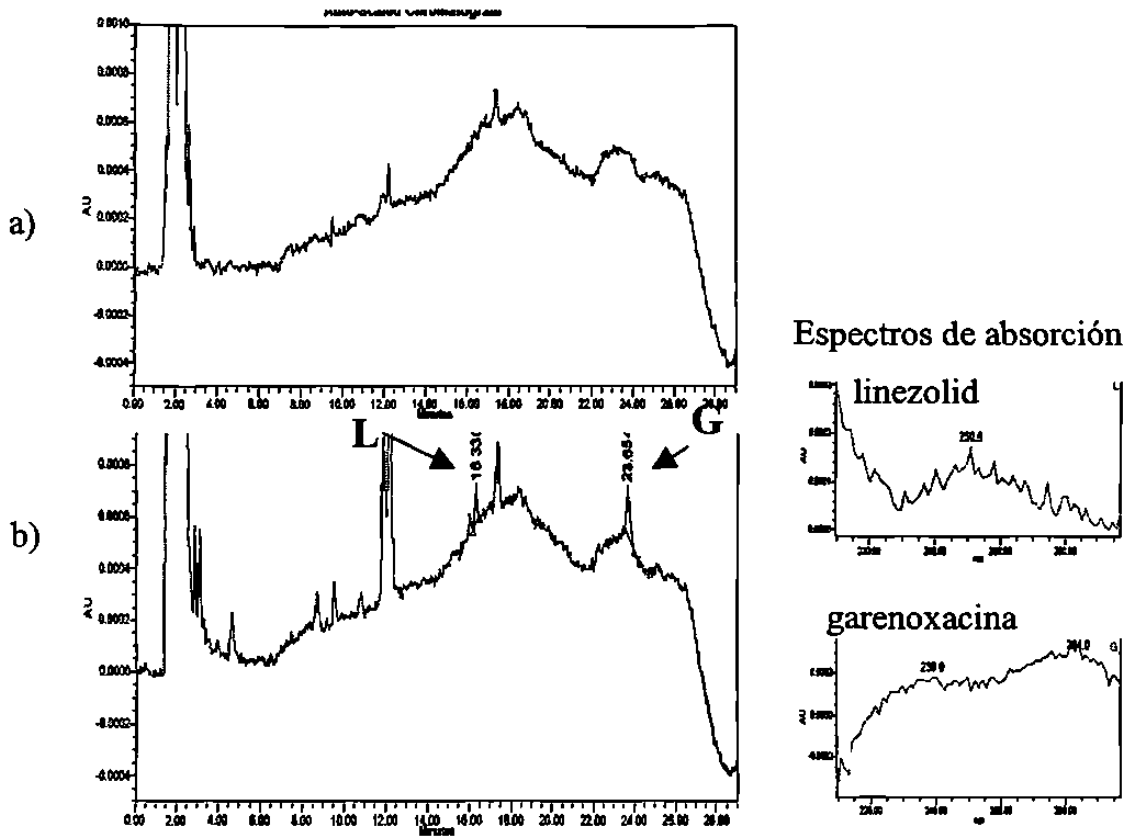


Figura 28. Análisis de linezolid y garenoxacina en tejido de ratón infectado con actinomicetoma y tratado con esta mezcla de antimicrobianos a) tejido blanco b) tejido con la mezcla. Los espectros de absorción de c) linezolid y d) garenoxacina se muestran en la parte izquierda del cromatograma

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

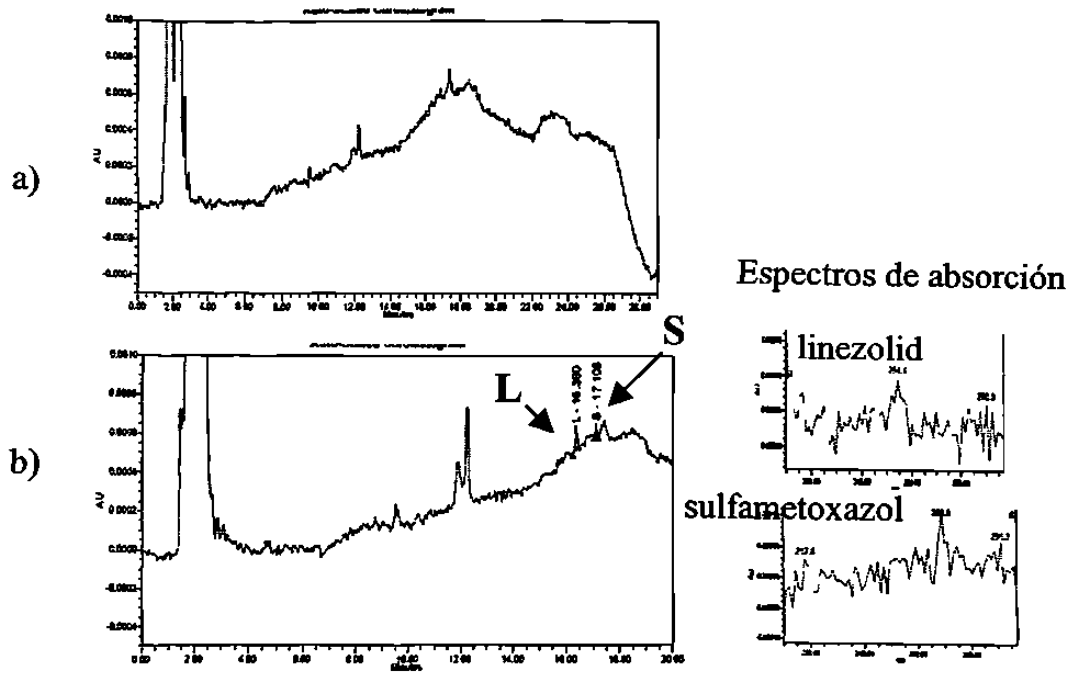


Figura 29. Análisis de trimetoprim-sulfametoxazol-linezolid en tejido de ratón infectado con actinomiceoma y tratado con esta mezcla de antimicrobianos a) tejido blanco b) tejido con la mezcla. Trimetprim menor al límite de detección del método. Los espectros de absorción se muestran a la izquierda del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

4

DISCUSIÓN

4.1 Desarrollo del método

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

4.1.1 Separación cromatográfica.

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

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

linezolid y sulfametoxazol fueron de 0.789, 1.49, 4.54 y 5.03 minutos respectivamente. Se intentó aumentar la retención de la amoxicilina con el cambio en la proporción de las fases móviles así como la concentración de trietilamina, pero en todos los casos el tiempo de retención fue menor de un minuto. También se analizó la amikacina, pero no fue detectada en UV. Se procedió a trabajar evaluando los parámetros de precisión y de linealidad solo para los analitos trimetoprim, sulfametoxazol y linezolid en solvente y en plasma. El plasma presentó una señal ancha y con un tiempo de retención de 2 minutos. El t_R del trimetoprim en plasma fue inferior al que presentó en solvente, de tal manera que su señal quedó dentro de la del plasma. Además, la resolución entre linezolid y sulfametoxazol también disminuyó. Después de esto se probó el cambio de condiciones para tratar de aumentar la retención, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que el sistema fue descartado.

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

Cromatografía de par iónico

La Cromatografía de fase reversa puede ser utilizada para la separación de compuestos iónicos, haciendo uso de la supresión de la ionización. Este método está

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

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

La cromatografía de par iónico presenta como ventajas el obtener tiempos de separación de los analitos cortos con resultados altamente reproducibles, los picos

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

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

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

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

En este trabajo se eligió el reactivo fosfato de tetrabutilamonio (TBA) 0.01 M, el cual se añadió a la fase móvil A, constituída por buffer de fosfatos 0.01 M pH de 7.2. La fase B fue acetonitrilo. En un principio se utilizó como fase estacionaria una columna C_{18}, pero durante el desarrollo del método, los cromatogramas que se obtenían presentaban picos cromatográficos asimétricos y todos presentaban un "hombro", muy constante y característico, lo cual indicó la pérdida de eficiencia de la columna, por lo que fue desacartada.

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

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

Antes de recurrir a una nueva columna, se plantearon otras alternativas de análisis. Se decidió probar una columna Atlantis dC_{18} de fase reversa. Las columnas Atlantis tienen una óptima combinación de densidad de grupo funcional C_{18}, y un recubrimiento de grupos silanoles residuales de la partícula de soporte ("endcapping") lo cual permite la retención de compuestos polares sin deformación

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

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

Posteriormente se procedió a preparar una mezcla con los siguientes antimicrobianos: amoxicilina, trimetoprim, sulfametoxazol, linezolid y garenoxacina. El cromatograma correspondiente mostró la primera señal con un tiempo de retención de 4.5 minutos y el resto de las señales dentro de los siguientes 30 minutos. Las señales fueron identificadas mediante sus espectros de absorción y se confirmó que se trataba de los cinco antimicrobianos componentes de la mezcla. Por lo anterior, se adoptó la columna Atlantis dC_{18} para establecer las condiciones óptimas de análisis y posteriormente la validación, tanto del sistema como de los métodos en

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

4.1.2 Análisis de Ácido clavulánico

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

4.1.3 Análisis de Amikacina

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

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

4.1.4 Métodos de detección

Análisis por Ultravioleta

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

Análisis por fluorescencia

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

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

4.2 Tratamiento de muestras

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

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

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

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

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

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

4.3 Validación

4.3.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación

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

.

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

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

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

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

4.3.2 Precisión

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

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

4.3.3 Exactitud

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

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

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

4.3.4 Robustez

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

4.3.5 Estabilidad

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

4.4 Aplicabilidad

4.4.1 Determinaciones en plasma

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

4.4.2 Determinaciones en tejido

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

Otra de las mezclas utilizadas fue linezolid-garenoxacina. Estos dos antimicrobianos tienen mecanismos de acción diferentes ya que, mientras linezolid actúa inhibiendo el proceso bacteriano de síntesis de proteínas previniendo así la formación del complejo funcional de iniciación de síntesis, la garenoxacina actúa sobre la DNA girasa, enzima esencial para la replicación, transcripción y reparación del DNA bacteriano. La actividad *in vitro* de la garenoxacina en contra de *N. brasiliensis* fue probada por Vera-Cabrera y col. Este antimicrobiano presentó una actividad alta, con MIC_{90} de 0.5 μg/mL (Vera-Cabrera 2003). Por lo anterior, la combinación linezolid-garenoxacina podría tener grandes posibilidades de ser un esquema también eficaz para el tratamiento contra actinomicetoma.

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

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

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

5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

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

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

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

4.-El sistema acetonitrilo-ac.trifluoroacético con la columna Atlantis dC_{18} resulta adecuado para el análisis cromatográfico de analitos no polares y aquellos que requieren de agente par iónico. Es necesario mantener las condiciones de análisis controladas ya que tienen influencia importante en el desempeño del método

5.2 Perspectivas

1. Aplicar el método desarrollado en el estudio de los antimicrobianos analizados para incrementar el conocimiento de su farmacocinética y farmacodinamia.

2. Desarrollar un método con mayor sensibilidad que permita la determinación de amikacina a un nivel de concentración menor que la concentración mínima inhibitoria (MIC) establecida para Nocardia.

3. Desarrollar un método con mayor sensibilidad para la determinación de ácido clavulánico.

4. Desarrollar las técnicas de tratamiento de muestra en otras matrices biológicas, particularmente en hueso de ratón.

5. Implementar el método desarrollado para la cuantificación de nuevos antimicrobianos propuestos para el tratamiento de actinomicetoma.

BIBLIOGRAFÍA

Abounassif M., Abdel-Moety E., Mohamed M., Gad-Kariem E. Liquid chromatographic determination of amoxicillin and clavullanic acid in pharmaceutical preparations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 9:731-735.(1991).

Agbaba D., Radovic A., Vladimirov S., Zivanov-Stakic D. Simultaneous TLC Determination of Co-trimazole and Impurities of Sulfanilamida and Sulfanilic Acid in Pharmaceuticals. Journal of Chromatographic Science. 34:460-464. (1996).

Arenas R. Micología Médica Ilustrada. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México, D.F.1993. pp 131-148

Bindligmeyer B.A. Practical HPLC Methodology and Applications. John Wiley & Sons. 1992. pp 153-157

Borner K. Determination of linezolid in human serum and urine by high performance liquid chromatography. International Journal of Antimicrobial Agents. 18:253-258. (2001).

Brandsteterova E., Kubalec P., Simko P., Machakova L. SPE-HPLC determination of trimethprim in tissue samples. Pharmazie (short comunication). 51: 984-986 (1996).

Cantú Garza H. A. Características Epidemiológicas y Clínicas de los pacientes con Micetoma en la consulta de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José E González. Tesis para grado de especialista. Febrero 2004.

Christian G. D. Analytical Chemistry. 5th Edition. Editorial John Wiley and Sons, N.Y. 1994. pp 36-37

Chromatography Columns and Supplies Catalog. Waters 2003-2004.

Colunga González L. Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos para la determinación de Gatifloxacina en Líquido Seminal de pacientes con infertilidad. Tesis de Doctorado. Febrero 2005.

Connor S., Everett J.R. High Resolution ^{1}H NMR Spectroscopic Studies of the Metabolism and Excretion of Ampicillin in Rats and Amoxicillin in Rats and Man. Journal of Pharmaceutical Pharmacology. 46: 128-134. (1994).

Cruces-Blanco C., Segura Carretero A., Fernández Peinado S., Román Ceba M., Fernández Gutiérrez A. Determination of the antibacterial drug sulfamethoxazole in pharmaceutical preparations containing trimethoprim by spectrofluorimetry after derivatization with fluorescamine. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 365: 444-447. (1999).

Chulavatnatol S., Charles B. High-performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in urine using solid phase, ion-pair extraction and ultraviolet detection. Journal of Chromatography, Biomedical Applications. 615: 91-96 (1993).

Daldovisio J., Pankey G. In vitro Suceptibility of *Nocardia asteroides* to Amikacin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 13,:128-129.(1978).

De Baere S., M. Cherlet, Baert K, P. De Backer. Quantitative Analysis of Amoxicillin and its mayor metabolites in animal tissues by Liquid Chromatography Combined with Electrospray ionization Tandem Mass Spectrometry. Analytical. Chemistry. 74, 1393-1401. (2002).

Dudley, Levitz R, R. Quintillani, J. Hickingbotham, C. Nightingale. Pharmacokinetics of Trimethporim and Sulfamethoxazole in serum and cerebrospinal Fluid of Adult Patients with Normal Meninges. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 26: 811-814. (1984).

Ehrlich M. et al. A new and rapid method for monitoring the new oxazolidinone antibiotic linezolid in serum and urine by high performance liquid chromatography-integrated sample preparation. Journal of Chromatography. 755:373-377. (2001).

Elmas M., Tras Bas., Yazar E., Umitli S., Birdane O. The disposition of Sulfamethoxazole-Trimethoprim combination after intrauterine administration in post-partum lactating cows. Israel Journal of Veterinary Medicine. 55:1-4. (2000).

Foulstone M, Reading C. Assay of Amoxicillin and Clavulanic Acid, the

components of Augmentin, in Biological Fluids with High Performance Liquid Chromatography. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 22:753-762. (1982).

Gee T., Ellis R., Marshall G., Andrews J., Ashby J., Wise R. Pharmacokinetics and tissue penetration of linezolid following multiple oral doses. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45: 1843-1846. (2001).

Godman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Décima Edición. Volumen II. Editorial Mc. Graw-Hill. 2003.

Gombert M. Succeptibility of *Nocardia asteroides* to various antibiotics, including newer beta-lactams, trimethoprim-sulfamthoxazole, amikacin, and N-formidoyl thienamycin. Antimicrobial agents and chemotherapy. 21:1011-1012. 1982).

Gómez-Flores A., Welsh O., Said Fernández S., Lozano-Garza G., Tavarez A., Vera- Cabrera L. *In vitro* and *In vivo* Activities of Antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48:832-837 (2004).

Gringauz A. Introduction to Medicinal Chemistry. How drugs act and why. Wiley-VCH Inc., 1997

Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Mayo 2001 http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm

Hayakawa H., Fukushima Y., Kato H., Fukumoto H., Kadota T., Yamamoto H., Kuroiwa H., Nishigaki J., Tsuji A. Metabolism and disposition of novel des-fluoro quinolone in experimental animals and interspecies scaling of pharmacokinetic parameters. Drug Metabolism and Disposition. 31:1409-1418. (2003).

Hoizey G., Lamiable D., C. Frances, Trenque T. Kaltenbach M., Denis J., Millart H. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC and UV detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30:661-666. (2002).

Isoherranen & Soback. Chromatographic Methods for Analysis of Aminoglycoside Antibiotics. Journal of AOAC International. 82: 1017-1045. (1999).

Krauwinkel J., Volkers-Kamermans N.J., van Zijtveld J. Determination of amoxicillin in human plasma by high–performance liquid chromatography and solid phase extraction. Journal of Chromatography. 617: 334-338. (1993).

Kutscha-Lissberg F., Hebler U., Muhr G., Kôller M. Linezolid Penetration into Bone and Joint Tissues Infected with Methicillin-Resistant Staphylococci. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 47: 3964-3966. (2003).

Lavalle P. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. Gaceta Médica de México. Tomo XCVI 1996. 545-569

Lee T., Brooks M.A. High Performance Liquid Chromatography determination of amoxicillin in human plasma using a bonded phase extraction. Journal of Chromatography. Biomedical Applications. :429-435 (1984).

Liang H., Kays M., Sowinski K. Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cianoxacin by high performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma. Journal of Chromatography B. 772 : 53-63. (2002).

López-Martínez L., López-de Alba P. L., de-León-Rodríguez L.M., Yépez Murieta M.L. Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulfamethoxipyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method. Journal of Pharmaceutical and Biomedycal Analysis. 30:77-85. (2002).

López-Martínez, R., L. Méndez-Tovar J., Lavalle P., Welsh O., Saul A., Macotela-Ruiz. E. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. Gaceta Médica Mexicana 128:477-481. (1992).

Luo W., Ang C. Determination of Amoxicillin Residues in Animal Tissues by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. Journal AOAC International. 83: 20-26. (2000).

Mahedero, T. Galeano, S. Galán Pascual. Determination of Sulfamethoxazole by photochemically induced fluorescence in drugs and milk. Talanta. 57:1-6. (2002).

Maitra S., Yoshikawa T., Stevn C., Guze L., Schotz M. Amikacin Assay in Serum by High-Performance Liquid Chromatography. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 14:880-885. (1978).

Marques de Cantú M.J. Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana de México S.A. de C.V. 1991 pp 361-373.

Mascher H. Determination of amoxicillin in human serum and plasma by high performance liquid chromatography and on-line postcolumn derivatization. Journal of Chromatography A. 812:221-226. (1998).

Menelaou A., Somogyi A., Barclay M., Bochner F. Simultaneous quantification of amoxicycillin and metronidazole in plasma using high performance liquid chromatography with photodiode array detection. Journal of Chromatography B. 731: 261-266.(1999).

Miller J., Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª Edición. Ed. Pearson Prentice Hall. Capítulo 5.

Mohamed G., Spectrophotomeric determination of ampicillin, dicluxacillin, flucloxacillin and amoxicillin antibiotic drugs: ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 24: 561-567. (2001).

Mutabingwa R., Kreiby S., Angelo HR., Fuursted K., Bygbjerg IC: A reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of cotrimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) in children treated for malaria. The Drug Monitoring. 21:609-614. (1999).

Ocaña J.A., Barragán F.J. Callejón M. Fluorescence and terbium-sensitised luminiscence determination of garenoxacin in human urine and serum. Talanta. 691-697. 2004.

Pajchel G., Pawlowski K., Tyski S. CE versus LC simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sublactam in pharmaceutical formulations for injections. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 29: 75-81. (2002).

Peng G. W., Stryd R., Shoiji M., Igarashi M., Chiba K., Aoyama H., Aoyama M., Zenki T., Ozawa N. Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 20: 65-73. (1999).

Quattrochi O., Abelaira S., Laba R. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. 1992 pp 324-327.

Renew J., Huang Ch. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulphonamide and thrimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1042: 113-121. (2004).

Salazar Cavazos M.L. Aminoácidos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Estudio de Perfiles en Frutos de diferentes especies de karwinskia. Tesis de maestría. U.A.N.L. Monterrey N.L. 1993.

Sánchez-Martínez M.L., Aguliar-Caballos M., Gómez-Hens A. Selective Kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 34:1021-1027. (2004).

Skoog D., Holler F., Nieman T. Principios de Análisis Instrumental 5ta Edición Mc Graw-Hill/Intermanericana de España S.A.U. 2001. Cap 28.

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH Topic Q 2 B Validation of Analytical Procedures: Methodology http://www.ich.org/guidelines Quality ICH Topic Q 2A

The Index Merck. An Encyclpoedia of Chemicals, drugs and biologicals. Merck Co. & Co. Thirteen edition. 2001.

Tobin C.M.,. Sunderland J, White L.O., McGowan A. P. A simple, isocratic high performance liquid chromatography assay for linezolid in human serum.

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

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

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

Vera-Cabrera, L., Gomez-Flores A., Escalante-Fuentes W. G, Welsh O. In vitro activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45.3629-3630. (2001).

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

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

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

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

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

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

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

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Norma Cecilia Cavazos Rocha

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica

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

Área de estudio: Química Analítica

Biografía:

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

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

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

TIPO DE ADQUISICION
DONA VO