



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA EVALUACION DEL EFECTO
DEL GENERO EN LA FARMACOCINETICA DEL
METRONIDAZOL EN RATAS WISTAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

IVAN MENDOZA HERNANDEZ



MEXICO, D. F.,



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

2005

m. 345062



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Garzón Serra Alfredo
Vocal	Prof. Jung Cook Helgi Helen
Secretario	Prof. García Aguirre Luis Jesús
1er. Suplente	Prof. Rodríguez Alvarado Sofia Margarita
2º. Suplente	Prof. Medina Reyes Liz Jannet

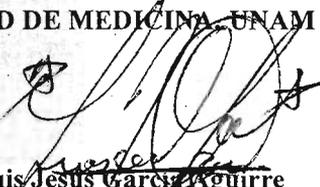
Síto donde se desarrollo el tema:

LABORATORIO DE FARMACOCINÉTICA

EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE MEDICINA UNAM

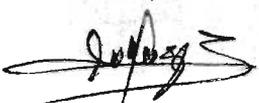
Asesor del tema:


M. en F. Luis Jesús García Aguirre

Supervisor técnico:


M. en F. Liz Jannet Medina Reyes

Sustentante:


Iván Mendoza Hernández

DEDICATORIAS

A Dios, por que he sentido que en cada paso que doy estas junto a mí, guiándome o bien dándome una lección. Te agradezco me permitieras existir y pertenecer a esa gran familia que tengo.

A mi Mama Justina, a la que quiero y admiro. Tu fuerza, valor, ternura, inteligencia han sido un ejemplo que ha marcado mi vida. Gracias por tu apoyo incondicional, sin ti, este nuestro triunfo no hubiera sido posible.

A mi Papa Fernando, por que tus consejos, tu experiencia, tu vida, me han hecho un hombre diferente.

A mis Hermanos Cielo, Fernando y Jesús, que han sido fundamentales en mi existir, gracias por todo su apoyo y por alentarme a ser mejor. Los quiero.

A mis sobrinos, que despertaron un sentimiento que sentía lejano.

A toda mi familia.

A mis amigos de la Universidad: Cesar, Rivelino, Dañu, Frausto, Toño, Héctor, Abraham, Mauricio, Jesús, Oscar, Marco Antonio, Aldo, Polo, Olivia, Diana, Jessica, Fabiola, Yeriley, Mari. GSK: Alejandra, Rosita, Maria Luisa, Yos, Pedro, Alfredo. BMS: Lola, Nalle, Vianey, Laura, Josué, Aaron, Marce, Elia, Luis, Micke, Olga, Reyna. Carmen, Sergio, Juan Carlos, Federico, Tomas y a los que me faltaron, gracias por su valiosa amistad.

A Lety, con quien he compartido mi vida sentimental y emocional, tu lograste hacerme sentir que estoy vivo. Por estos años juntos, gracias.

A mis asesores: Luis J. García Aguirre y Liz J. Medina Reyes por la paciencia que tuvieron para la culminación de este documento. Se los agradezco de corazón.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	II
1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. GENERALIDADES	5
3.1. FARMACOCINÉTICA	6
3.1.1. Etapas de la actividad terapéutica	
3.1.4. Fase biofarmacéutica	
3.1.3. Fase farmacocinética	
3.1.3.1. Absorción	
3.1.3.2. Distribución	
3.1.3.3. Metabolismo y excreción	
3.1.2. Fase farmacodinámica	
3.2. DETERMINANTES DE LA ACTIVIDAD DE LOS MEDICAMENTOS	15
3.3. EL IMPACTO DEL GENERO EN LA ADMINISTRACION DE FARMACOS	17
3.4. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL METRONIDAZOL	19
3.5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL METRONIDAZOL	20
3.5.1. Historia	
3.5.2. Indicaciones terapéuticas	
3.5.3. Farmacocinética	
3.5.4. Farmacodinamia	
3.5.5. Resistencia	
3.5.6. Dosis y administración	
3.5.7. Efectos colaterales	
3.5.7. Interacción con otros medicamentos	
3.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	27
3.7. MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE METRONIDAZOL EN TEJIDOS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS	29
3.7.1. Métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución	
4. PARTE EXPERIMENTAL	32
4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO POR CLAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METRONIDAZOL EN PLASMA	33
4.1.1. Material, reactivos y equipos	
4.1.2. Preparación de soluciones	
4.1.3. Preparación de las curvas de calibracion	
4.1.4. Preparación de los puntos control	
4.1.5. Selección de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max})	
4.1.6. Elección de la columna cromatográfica	
4.1.7. Selección del estándar interno	

4.1.8. Optimización de la fase móvil	
4.1.9. Optimización del método de extracción	
4.2. VALIDACIÓN DE SISTEMA PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN METANOL	41
4.2.1. Linealidad y precisión del sistema	
4.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN PLASMA	42
4.3.1. Linealidad del método	
4.3.2. Precisión	
4.3.3. Exactitud	
4.3.4. Recuperación absoluta	
4.3.5. Límite de cuantificación	
4.3.6. Límite de detección	
4.3.7. Estabilidad	
4.3.7.1. Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente	
4.3.7.2. Estabilidad de las muestras en congelación a largo plazo (-70°C)	
4.3.7.3. Estabilidad de las muestras en refrigeración a 5°C	
4.3.8. Selectividad	
4.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL GÉNERO EN LA FARMACOCINÉTICA DEL METRONIDAZOL EN RATAS WISTAR	46
4.4.1. Selección de los animales de estudio	
4.4.2. Diseño experimental	
4.4.3. Protocolo experimental	
4.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS	48
4.5.1. Puntos control de calidad	
4.5.2. Cuantificación de las muestras plasmáticas	
4.5.3. Análisis farmacocinético	
4.5.4. Análisis estadístico	
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	51
5.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO POR CLAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METRONIDAZOL EN PLASMA	52
5.1.1. Selección de la longitud de onda	
5.1.2. Elección de la columna cromatográfica	
5.1.3. Selección del estándar interno	
5.1.4. Selección de la fase móvil	
5.1.5. Desarrollo del método de extracción	
5.2. VALIDACIÓN DEL SISTEMA PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN METANOL	56
5.2.1. Linealidad y precisión del método	
5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN PLASMA	58
5.3.1. Linealidad del método	
5.3.2. Repetibilidad y exactitud interdia	
5.3.3. Reproducibilidad y exactitud interdia	
5.3.4. Recuperación relativa	

5.3.5. Límite de cuantificación y detección	
5.3.6. Estabilidad	
5.3.6.1. Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente	
5.3.6.2. Estabilidad de las muestras en congelación (-70°C)	
5.3.6.3. Estabilidad de las muestras en refrigeración a 5°C.	
5.3.7. Selectividad	
5.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL GÉNERO EN LA FARMACOCINÉTICA DEL METRONIDAZOL EN RATAS WISTAR	68
5.5. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO	72
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL GÉNERO EN LA FARMACOCINÉTICA DEL METRONIDAZOL	73
6. CONCLUSIONES	74
7. BIBLIOGRAFÍA	75
APÉNDICE I	79
APÉNDICE II	91
APÉNDICE III	94

1. RESUMEN

1. RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de evaluar la influencia del género en la farmacocinética del metronidazol en ratas Wistar.

El estudio se realizó en 12 ratas Wistar sanas (6 hembras y 6 machos) a las cuales se les administró una dosis única de 25mg/Kg de peso de metronidazol por vía oral de acuerdo a la dosis promedio suministrada en humanos. Las muestras sanguíneas fueron colectadas al tiempo cero y a las 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 24.0, 27.0 y 30.0 horas después de la administración, con la finalidad de caracterizar al menos el 80% del área bajo la curva de concentración plasmática con respecto al tiempo.

Los niveles de metronidazol en plasma se determinaron por un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), previamente validado, el cual fue lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentración de 0.5 a 50.0 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados obtenidos para $ABC_{0-\text{inf}}$, C_{max} , T_{max} para ratas hembra fueron: $150.15 \pm 67.81 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, $10.99 \pm 6.45 \mu\text{g/mL}$, $4.89 \pm 2.27 \text{ h}$ y ratas macho fueron: $96.71 \pm 28.57 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, $9.2950 \pm 4.72 \mu\text{g/mL}$, $4.10 \pm 3.17 \text{ h}$, respectivamente.

Se realizó un análisis estadístico usando la t de student y ANADEVIA de los parámetros farmacocinéticos de metronidazol entre ratas hembras y machos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en la evaluación del efecto del género.

2. ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

La biodisponibilidad de los fármacos depende, además de las propiedades fisicoquímicas del principio activo (solubilidad, pKa, polaridad, etc.), de la forma farmacéutica que lo contiene (tabletas, supositorios, suspensión, cápsulas), de las condiciones de salud del paciente (enfermo o sano), de aspectos fisiológicos tales como complejión, raza, edad, menopausia e inclusive de si es administrado a hombres o mujeres. Esta última variable pocas veces estudiada nos hace formularnos la siguiente pregunta: ¿Qué tan diferente puede ser la biodisponibilidad del metronidazol tratándose de una variable como el género? Esta pregunta la responderé al final de mi proyecto de tesis.

Trabajos de investigación realizados en nuestro laboratorio, han mostrado un probable efecto del género sobre la farmacocinética del metronidazol en el humano. El metronidazol es un fármaco de uso común en México, por tal motivo y con la intención de caracterizar la relación entre la farmacocinética del fármaco y el género, se realizará un estudio de farmacocinética en ratas Wistar, cuyo metabolismo de metronidazol es muy semejante al del humano.

Con base en lo anterior los objetivos planteados para este proyecto fueron:

1.- OBJETIVO GENERAL: Evaluar el efecto del género en la farmacocinética del metronidazol en ratas Wistar

2.- OBJETIVO ESPECÍFICO: Optimizar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de los niveles de metronidazol en plasma.

3. GENERALIDADES

3. GENERALIDADES:

3.1. FARMACOCINÉTICA

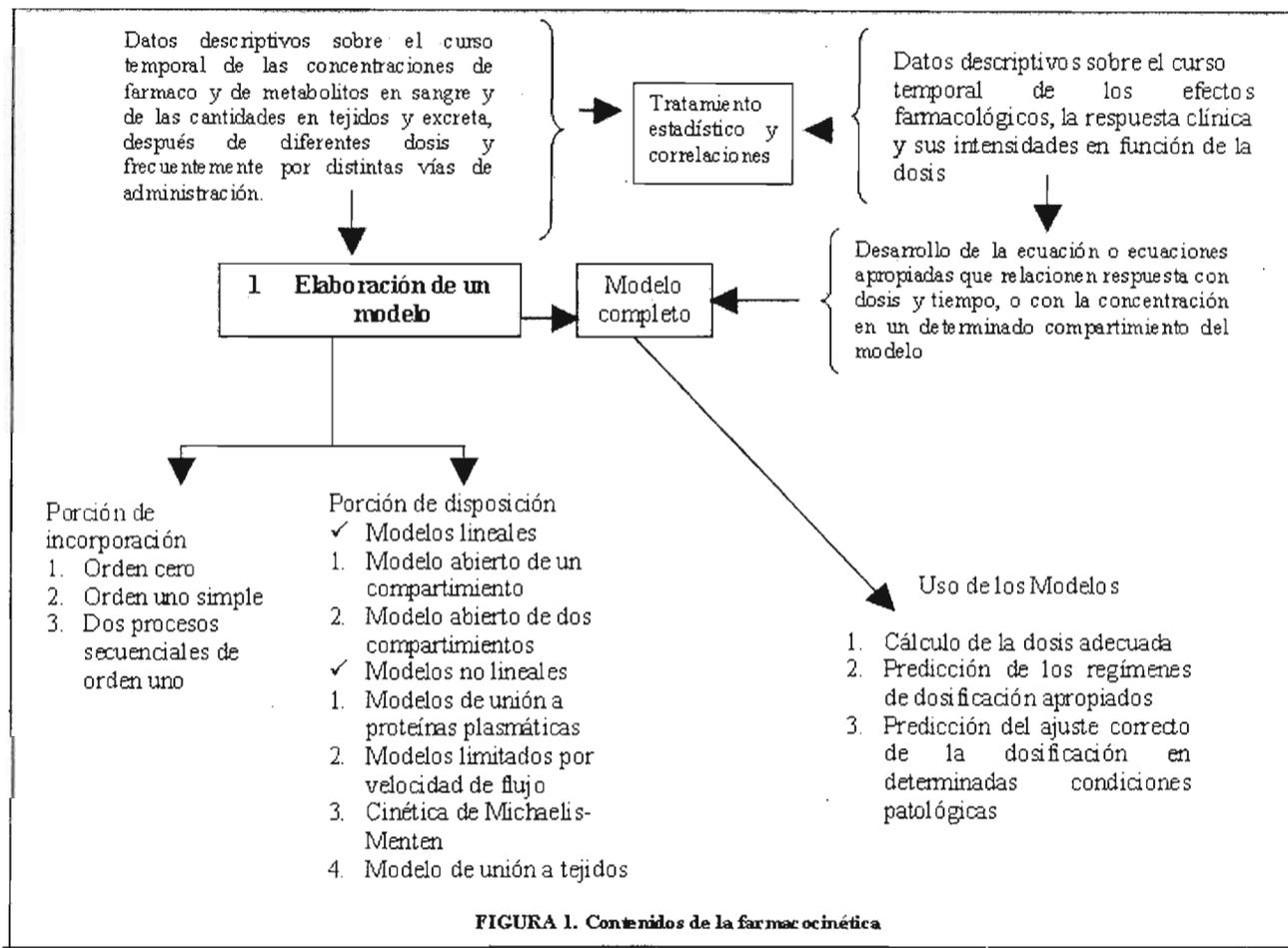
El termino farmacocinética fue acuñado por el profesor F. H. Dost, en Alemania, quien la definió como “la ciencia del análisis cuantitativo entre organismo y medicamento “El objetivo de la farmacocinética consiste en estudiar la evolución temporal de las concentraciones, cantidades de medicamento y metabolitos en fluidos biológicos, tejidos, heces y construir modelos adecuados para interpretar los datos obtenidos ⁽¹⁾.

Otros autores definen a la farmacocinética como el estudio y caracterización de la evolución temporal de los fármacos y de sus metabolitos en el organismo, a través del análisis cinético de las curvas de concentración con respecto al tiempo o cantidad con respecto al tiempo obtenidas a partir de muestras de fluidos biológicos ⁽²⁾.

El objetivo de la farmacocinética es transformar los datos a parámetros significativos y usar estos para formular predicciones acerca de los resultados de futuros ensayos o series de estudios. ⁽³⁾

En la figura 1 se muestra una representación esquemática de la farmacocinética, en la cual se puede observar que esta no tan sólo hace referencia a la interpretación de los perfiles de concentración de fármaco en el organismo con respecto al tiempo, sino también al desarrollo de modelos matemáticos que se ajustan a los datos obtenidos con la finalidad de predecir su comportamiento. Estos modelos matemáticos pueden ayudarnos de manera mas explícita a: calcular la dosis adecuada, establecer los regímenes de dosificación adecuadas y algo también muy importante es el poder predecir el ajuste correcto de la dosificación para un paciente con determinadas condiciones patológicas, siempre

considerando que dichos modelos deberán comprobarse para evaluar sus propiedades predictivas.⁽³⁾

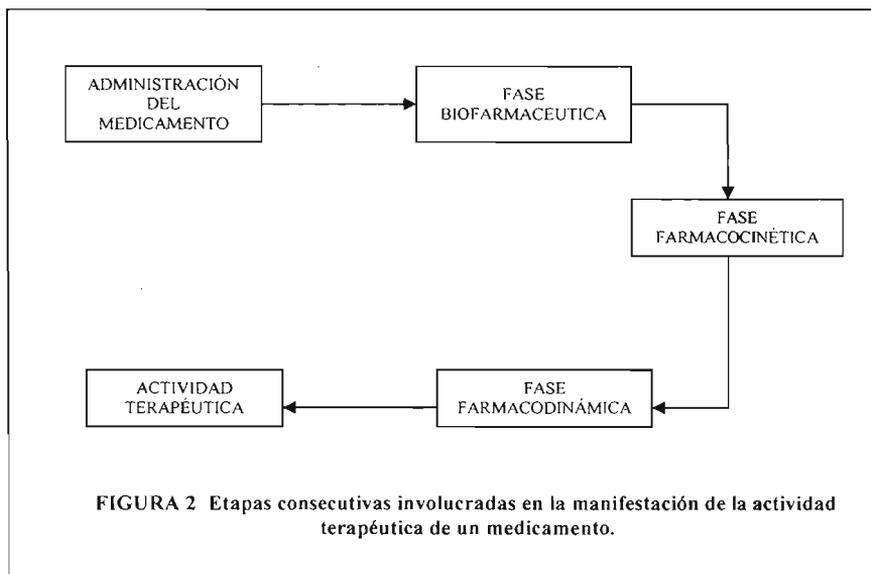


En un futuro el objetivo de la farmacocinética deberá consistir en elaborar modelos que no se limiten tan solo a explicar la variación de concentración y cantidades de fármaco y metabolitos en el transcurso del tiempo, sino que permitan, además, explicar la respuesta farmacológica o clínica del principio activo o de uno o varios de sus metabolitos. ⁽³⁾

A continuación, se dará una idea acerca de como a evolucionado el aspecto relacionado a la calidad biofarmaceutica de los medicamentos.

3.1.1 Etapas de la actividad terapéutica

El empleo de principios activos con fines terapéuticos o de farmacoterapia, tiene como objetivo lograr una respuesta terapéutica en el organismo. Esta actividad observada después de la administración de un medicamento, es el resultado de una serie de fenómenos o etapas consecutivas, las cuales están en función tanto del fármaco por si mismo, como del individuo al que se administra. Estas etapas generales son: Biofarmaceutica, Farmacocinética y Farmacodinámica, ver figura 2.



3.1.2. Fase biofarmaceutica y efecto terapéutico ⁽³⁾

La fase biofarmaceutica es la primera de las etapas conducentes al efecto terapéutico. Esta etapa es crítica para las dos posteriores ya que, aunque las fases farmacocinética y farmacodinámica son función básicamente de la interacción entre el fármaco y el organismo, el correcto suministro del principio activo al organismo, las características fisicoquímicas del mismo, la cantidad, velocidad y periodicidad, permitirán la adecuada modulación de la actividad y, por tanto, la respuesta terapéutica adecuada para el organismo.

Lo anterior puede lograrse solo si la vía de administración, la forma farmacéutica y el régimen de dosificación son adecuados. Es decir, estos son los tres factores susceptibles de ser controlados. Para relacionar la etapa biofarmaceutica con las otras dos consecutivas, se deben considerar las siguientes premisas.

- A. Los fármacos son administrados al organismo en formas farmacéuticas. Es decir, una forma farmacéutica debe considerarse como un sistema de entrega del fármaco. Las formas farmacéuticas son sistemas física y químicamente complejos, formados por la mezcla de uno o mas principios activos y varios excipientes.
- B. Para que un fármaco llegue a la circulación sanguínea a partir del sitio en que fue depositado, debe estar como molécula libre y disuelta en los fluidos orgánicos. En otras palabras, ni los excipientes ni las moléculas endógenas deben ser puntos de unión fuerte o incluso irreversible con el fármaco.
- C. Las diferentes vías de administración pueden modificar tanto la velocidad como la cantidad de fármaco que llegue a la sangre, a partir del sitio en que fue depositado o aplicado el medicamento. El caso típico de estas modificaciones de

biodisponibilidad según la vía de administración, es el llamado *efecto de primer paso*. es decir, la eliminación de una parte de la dosis del fármaco activo, antes de que este alcance a llegar a la circulación general.

D. El punto de partida para las fases farmacocinética y farmacodinámica, en el caso de fármacos de acción sistémica, es la presencia del fármaco en sangre.

E. En resumen, se asume que el efecto terapéutico de un fármaco, esta en función de la concentración plasmática del mismo; lo cual a su vez, se relaciona con la cantidad y velocidad con que el fármaco llega a la sangre.

3.1.3 Fase farmacocinética ⁽³⁾

Para que un fármaco llegue al sitio receptor o de acción, a partir del lugar en que fue depositado, se requiere que este sea transportado a través del organismo. Las características de este transporte en el cuerpo pueden variar según las propiedades fisicoquímicas del fármaco, de la fisiología de las distintas especies que lo reciban y dentro de la misma especie, del estado fisiopatológico de dicho organismo receptor.

Al igual que la fase farmacodinámica, la fase farmacocinética es función de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y del estado fisiopatológico del organismo receptor. El único factor de modulación o control externo, es el régimen de dosificación o posología aplicada. Es decir, una vez iniciadas las fases farmacodinámica y farmacocinética, no se puede tener sobre ellas prácticamente ningún control externo para modular el efecto terapéutico (Figura 3).

La evolución temporal de un fármaco en el organismo se puede esquematizar en cuatro etapas, cuyo desarrollo in vivo es prácticamente simultaneo: absorción distribución, metabolismo y excreción.

3.1.3.1 Absorción ⁽³⁾

La absorción de un principio activo implica el paso de las moléculas del mismo, desde el sitio en que se depositó el medicamento, hacia la sangre, a través de una barrera fisiológica (membranas). Para que este fenómeno ocurra, el fármaco debe ser primero liberado de los excipientes que lo acompañan y posteriormente solubilizado en los fluidos fisiológicos. Cuando el fármaco se aplica en la modalidad de dosis múltiples (multidosis), se alcanza un equilibrio después de cierto tiempo entre la velocidad de entrada de fármaco al organismo y su velocidad de salida.

3.1.3.2 Distribución ⁽³⁾

Las moléculas del principio activo disueltas en la corriente sanguínea, son susceptibles de ser transportadas hacia todas las regiones del organismo. Lo anterior está en función de factores tales como: el coeficiente de partición del fármaco entre la sangre y el tejido, su grado de unión a proteínas plasmáticas y/o tisulares, flujo sanguíneo y otros.

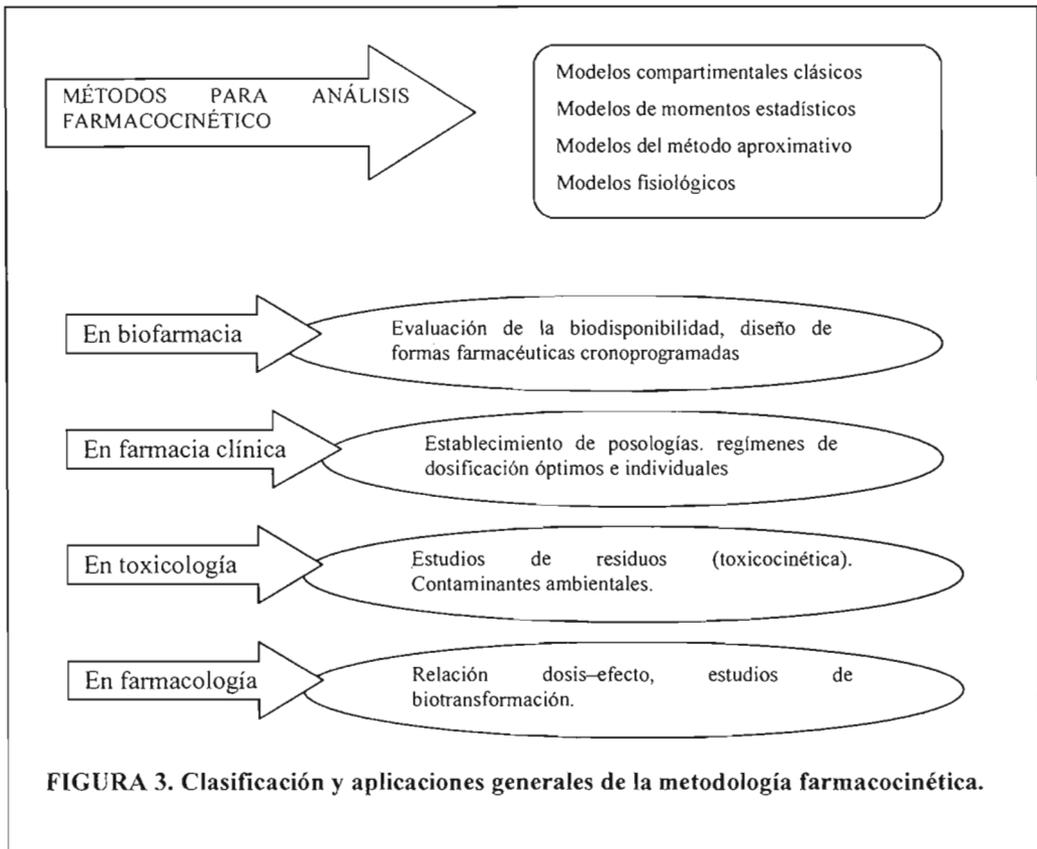
3.1.3.3 Metabolismo y excreción ⁽³⁾

La presencia de una molécula exógena en el organismo desencadena fenómenos que conducen a la desaparición del mismo. Un fármaco puede ser excretado del organismo como tal (molécula inalterada) o como molécula metabolizada. El órgano principal para la metabolización de fármacos es el hígado y este proceso tiene como objetivo en general, inactivar y aumentar la polaridad de la molécula de modo que pueda ser fácilmente excretada por vía renal en la orina. Sin embargo, cabe recordar que algunos metabolitos de fármacos, han resultado tener actividad farmacológica. Otras vías de excreción además de la hepática son: renal, excreción fecal (directa o por bilis), pulmonar y dérmica entre otras.

En farmacocinética, la suma y descripción de los procesos de distribución, biotransformación y excreción de fármacos, recibe el nombre de disposición

Para la mayoría de los fármacos a dosis terapéuticas, los fenómenos cinéticos descritos anteriormente (ADME), son caracterizados por constantes aparentes de primer orden. No obstante, uno o varios de estos procesos en un caso dado puede ser definido no por una farmacocinética lineal, sino por una farmacocinética que esta en función de la dosis, conocida también como cinética de orden cero.

La evolución de la farmacocinética ha hecho de ella, dentro de las ciencias farmacéuticas, una disciplina independiente. En la figura 4 se resumen la evolución y aplicaciones generales del método farmacocinético en las ciencias farmacéuticas y médicas.

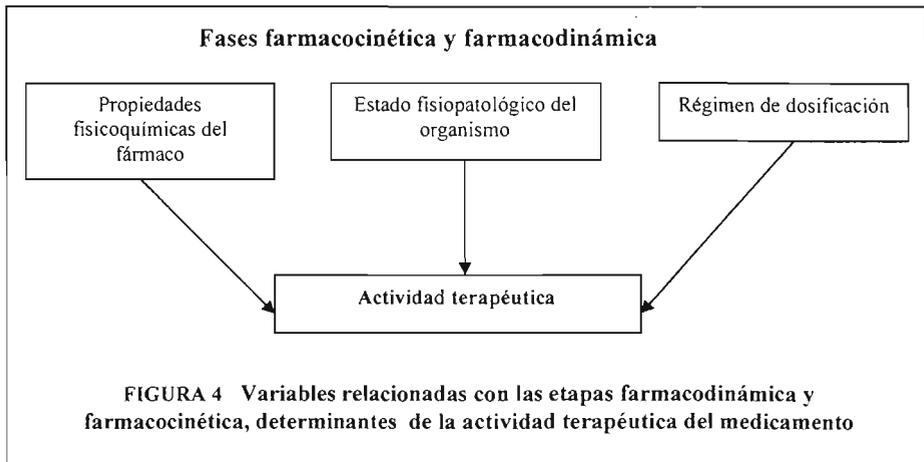


3.1.4 Fase farmacodinámica ⁽³⁾

La fase farmacodinámica involucra la interacción entre el principio activo y el organismo al cual fue administrado.

Se ha observado que con frecuencia hay una relación entre un efecto farmacológico medible y los niveles plasmáticos (concentraciones) del fármaco. En esta fase farmacodinámica, la concentración del principio activo en la biofase o sitio de acción del fármaco, es el parámetro principal de la respuesta. En la figura 3 se resumen los tres aspectos principales que intervienen en la fase farmacodinámica de la respuesta terapéutica.

Como puede observarse, la fase farmacodinámica es función de las propiedades fisicoquímicas de cada principio activo, y en función de ellas esta su interacción con el organismo. Por lo tanto una vez que se inicia esta etapa no es controlable por factores externos.



Ahora citaremos los determinantes que afectan la actividad de un fármaco, entendiendo por determinante, aquel factor que ejerce una influencia decisiva en la actividad farmacológica.

3.2. DETERMINANTES DE LA ACTIVIDAD DE LOS MEDICAMENTOS

En la parte superior de la figura 5 se puede observar la siguiente secuencia: absorción -- distribución, metabolismo y excreción --- efectos farmacológicos -- respuesta clínica. Los factores que implican absorción del fármaco se denominan “factores de entrada”; debe puntualizarse, no obstante, que también son tipos de entrada la administración del fármaco por inyección intravenosa o por perfusión intravenosa a velocidad constante. Los factores que suponen distribución, metabolismo y excreción del fármaco se denominan “factores de disposición”. Del mismo modo, los efectos farmacológicos que se observan están influidos por varios factores farmacológicos y existen muchos factores clínicos que influyen en la respuesta clínica observada. Todos los factores que se indican en la parte superior de la figura situados por encima de la palabra interacciones se denominan en conjunto “factores mecanísticos”. En la parte inferior de la figura, los factores fisiológicos se dividen en dos grandes grupos. En primer lugar y a la izquierda, se indican los implicados en la absorción de los medicamentos por vía gastrointestinal, parenteral, percutánea y rectal. En la parte derecha de la tabla se enumeran 18 factores, desde raza, hasta efectos placebo e inespecíficos. No todos los factores anotados son determinantes de la actividad para todos los fármacos, pero se sabe que cada uno de los 18 es importante como determinante de la actividad de uno o más fármacos. ⁽²⁾

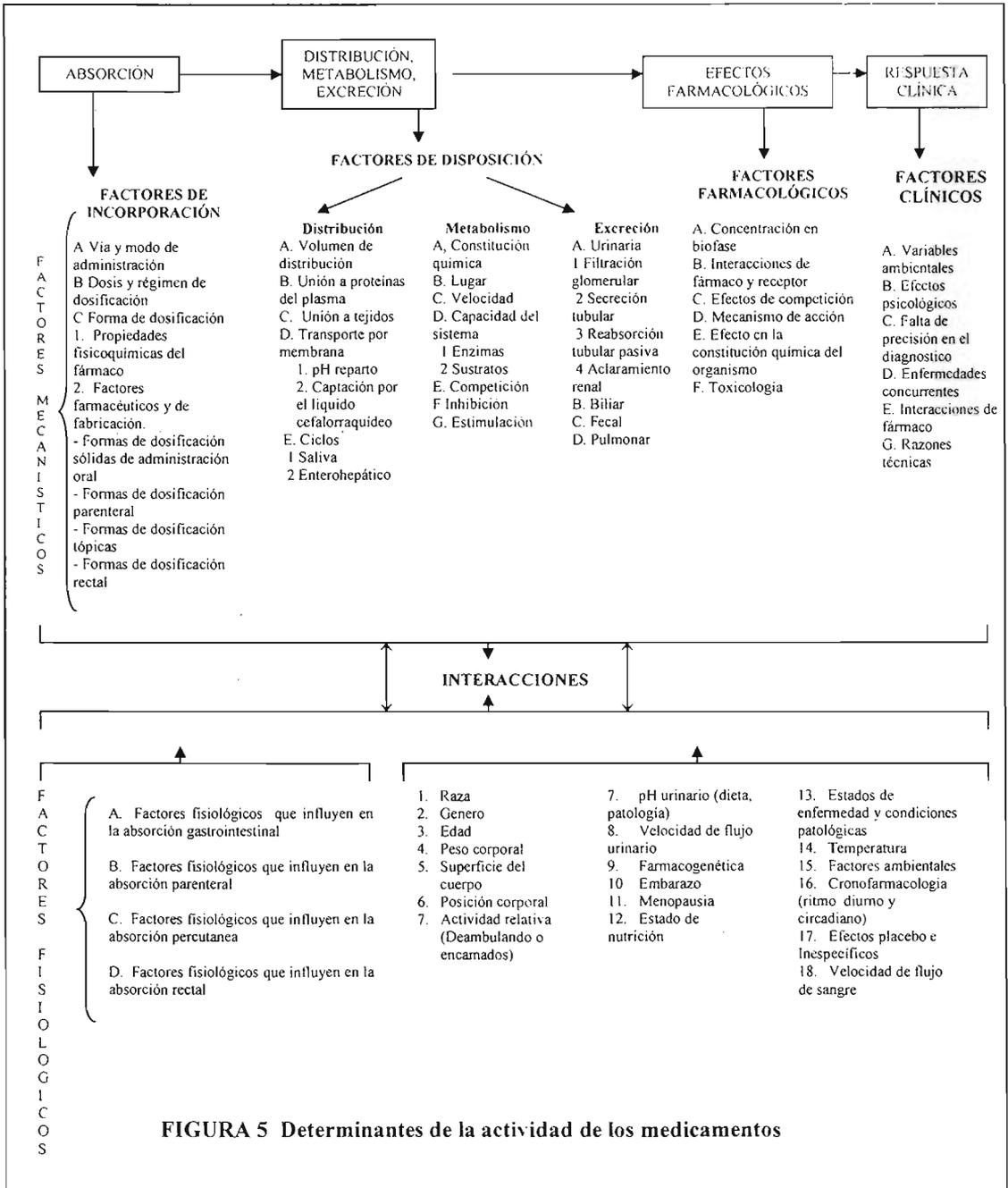


FIGURA 5 Determinantes de la actividad de los medicamentos

3.3. EL IMPACTO DEL GÉNERO EN LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS.

La experimentación animal ha permitido observar que en un grupo homogéneo (cepa, sexo, peso), la respuesta a las agresiones de cualquier origen (física o química) pueden variar de un individuo a otro; incluso en el hombre el efecto de un fármaco esta lejos de ser constante²³. Es por esto que el género en los estudios clínicos se ha vuelto importante.

Aunque el somatotipo puede modificar la distribución y la eliminación de los fármacos según los sujetos, deben señalarse también las influencias hormonales.

Se ha encontrado que los andrógenos aceleran las reacciones de hidroxilación (hexobarbital, pentobarbital), las reacciones de N-desmetilación (piramidon, morfina) y las de glucuroconjugación, haciendo que sean mas rápidas en la rata macho que en la rata hembra. Estos fenómenos no se producen después de la castración; la testosterona aumenta la actividad de las enzimas de desintoxicación mientras que los estrógenos tienen el efecto inverso¹⁶.

Por lo tanto, podemos afirmar que las diferencias en cuanto al sexo influyen en la gravedad de algunas enfermedades en el hombre, como en el caso de la hipertensión. El aumento tensional se acompaña de una lesión mayor en el órgano “de choque” o terminal en los varones, en comparación con las mujeres, y por esta razón, en ellos hay la tendencia a utilizar fármacos mas potentes. Por lo expuesto, el género de una persona puede constituir un factor importante en el planteamiento del tratamiento y en forma directa, en la aparición de reacciones adversas a medicamentos.¹⁷

Las ratas han sido la especie mas estudiada. En esta especie los andrógenos estimulan la actividad microsomal en conjunto con la función oxidasa. Tal inducción se

refleja en una mayor eliminación en ratas machos que en ratas hembras, sobre todo en fármacos susceptibles de ser oxidados¹⁸.

A 32 hombres y mujeres se les suministro 30 mg por vía oral de temazepam, un benzodiazepido hipnótico. El tiempo de vida media de temazepam en mujeres y hombres respectivamente fue 17 vs 12 horas y el aclaramiento renal en $1.0 \text{ ml/min} \times \text{Kg}$ de peso vs $1.35 \text{ ml/min} \times \text{Kg}$ de peso respectivamente. Diferencias similares se observaron cuando se suministro oxazepam¹⁸.

La farmacocinética de otras benzodiazepinas, clordiazepoxidos han sido determinadas en hombres y mujeres. El tiempo de vida media para el clordiazepoxido es mas largo en mujeres que en hombres (15 hrs vs 9 hrs) pero no se encontraron diferencias significativas en el aclaramiento renal. Tales estudios nos indican que el metabolismo de este tipo de benzodiazepinas es mas eficiente en hombres que en mujeres.¹⁸

3.4. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL METRONIDAZOL

a. Nombre genérico: Metronidazol

b. Nombre químico:

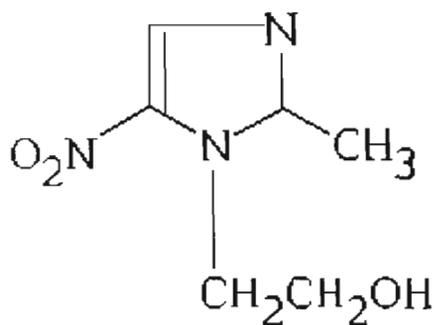
2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol; 2-metil-5-nitro-1-midazoetanol; 1-(2-hidroxietyl)-2-metil-5-nitroimidazol. ⁽⁴⁾

c. Nombre común:

Metronidazol, Flagyl, Flagenase

d. Formula condensada: $C_6 H_9 N_3 O_3$

e. Formula estructural :



f. Descripción: Polvo cristalino de color blanco a crema, de olor débil, de sabor amargo y ligeramente salino, estable al aire, se oscurece al exponerlo a la luz. ⁽⁴⁾

g. Solubilidad: Soluble en ácidos débiles, ligeramente soluble en agua, alcohol y muy ligeramente soluble en éter dietílico, acetona y cloruro de metileno ⁽⁴⁾

h. Punto de fusión: entre 159 y 163°C ⁽⁴⁾

- i. Espectro de Absorción UV: En HCl 0.1 N exhibe un máximo a 277 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 380$). La solución en metanol presenta un máximo de absorción a los 318 nm. ⁽⁵⁾
- j. Espectro de absorción al IR: En disco de bromuro de potasio, exhibe picos característicos a A: 1187 o 1535, B: 1365 o 1485, C: 1070 o 1467 ⁽⁵⁾
- k. Conservación: En envases bien cerrados y protegidos de la luz
- l. $pK_a = 2.62$ ⁽⁶⁾
- m. Formas farmacéuticas: Crema vaginal al 10%; Solución inyectable 500 mg (amortiguado con fosfatos y citratos pH = aprox. 6.0); Supositorios vaginales de 500 mg, tabletas de 250 y 500 mg; Tabletas vaginales 500 mg; Suspensión de 250 mg. ⁽⁵⁾

3.5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL METRONIDAZOL

3.5.1 Historia

El descubrimiento de la zomicina (2-nitroimidazol) en 1955 y la demostración de sus propiedades tricomicidas por parte de Horie (1956) fueron los puntos de partida de la síntesis química y el estudio biológico de muchos nitroimidazoles. Se observó que el compuesto, 1-(β -hidroxiethyl)-2-metil-5-nitro-imidazol, llamado ahora metronidazol, poseía actividad antiprotozoaria tanto *in vitro* como *in vivo* contra *T. Vaginalis* y *E. Histolytica*. Durel y colaboradores (1960) indicaron que después de la administración por vía oral se presentaba actividad tricomicida en el semen y en la orina y se podían obtener cifras altas de curación en varones y mujeres con tricomoniasis. El metronidazol posee un espectro extraordinariamente amplio de actividad antiprotozoica y antimicrobiana por lo que se

utiliza ampliamente en seres humanos. Fuera de Estados Unidos se emplean en el humano otros 5-nitroimidazoles, cuya estructura y actividad es muy similar a la del metronidazol, estos incluyen tinidazol, nimorazol y ornidazol y el benznidazol el cual es eficaz en la enfermedad de Chagas. ⁽¹⁾

3.5.2. Indicaciones terapéuticas

El metronidazol es activo contra muy diversos protozoos, parásitos anaerobios y bacterias anaerobias. Tiene acción tricomicida directa. Las formas sensibles de *T. Vaginalis* son destruidas empleando concentraciones menores a 0.05 µg/mL del fármaco en un medio anaeróbico; se necesitan concentraciones mayores cuando existe oxígeno al 1.0%. El producto también posee notable actividad amebicida contra *E. Histolytica*. A concentraciones de 1 a 50 µg/mL *in vitro* afecta de manera directa a trofozoitos de *G. Lamblia*, además de que posee actividad antibacteriana contra todos los cocos anaeróbicos y bacilos gramnegativos anaerobios, incluidas especies de bacteroides y bacilos grampositivos no esporulados. Clínicamente es eficaz en la tricomoniasis, amebiasis y giardiasis, y en diversas infecciones causadas por bacterias anaerobias como especies de *Bacteroides*, *Clostridium* y *Helicobacter*. Otros efectos de los nitroimidazoles incluyen supresión de la inmunidad celular, mutagénesis, carcinogénesis y sensibilización de células hipóxicas a la radiación. Además es un agente antibacterial sintético, se usa principalmente para el tratamiento de infecciones anaeróbicas especialmente en infecciones intrabdominales, infecciones de piel, infecciones vaginales, septicemias, infecciones óseas, infecciones en el sistema nervioso central, infecciones en el tracto respiratorio y endocarditis. También en la prevención de infecciones post-operatorias. ⁽¹⁾

3.5.3. Farmacocinética

Absorción

El fármaco es usualmente absorbido en forma rápida y total (biodisponibilidad 100%), después de una administración oral, alcanzando concentraciones máximas en plasma (C_{max}) de aproximadamente 10 $\mu\text{g/mL}$, una hora después (T_{max}) de la administración de una dosis única de 500 mg.⁽¹⁾

Distribución

En la mayor parte de los protozoarios y bacterias susceptibles, la concentración promedio efectiva del fármaco es de 8.0 $\mu\text{g/mL}$.

Los modelos farmacocinéticos demuestran que el metronidazol tiene un volumen aparente de distribución 1 L/kg, que es grande, lo cual confirma las altas concentraciones encontradas en la mayoría de los tejidos analizados: hueso, tejido de la pelvis, fluido seminal y saliva, entre otros.

Alrededor del 10% del metronidazol se encuentra unido a proteínas plasmáticas.⁽¹⁾

Metabolismo

El hígado es el sitio principal de metabolismo de metronidazol; los metabolitos principales son el resultado de la oxidación de las cadenas laterales y la formación de glucuronidos. La orina de algunos paciente se puede tornar rojiza pálida debido a la presencia de pigmentos no identificados derivados del fármaco.

Los compuestos que se forman son los metabolitos hidróxido y ácido que se forman por la oxidación de la cadena lateral (1-hidroxietil-2-hidroximetil-5-nitroimidazol y 2-metil-5-nitroimidazol-1-ácido acético) y también se forman los derivados glucuronidos

correspondientes mediante la conjugación glucoronida. Los metabolitos que resultan de la oxidación se presentan en la orina (Figura 6).

Cabe mencionar que existen similitudes metabólicas interespecies. En ese sentido, el humano y la rata metabolizan de manera semejante a metronidazol, por lo que los resultados que se obtengan en este trabajo serán significativos para estudios posteriores en humanos.⁽⁷⁾

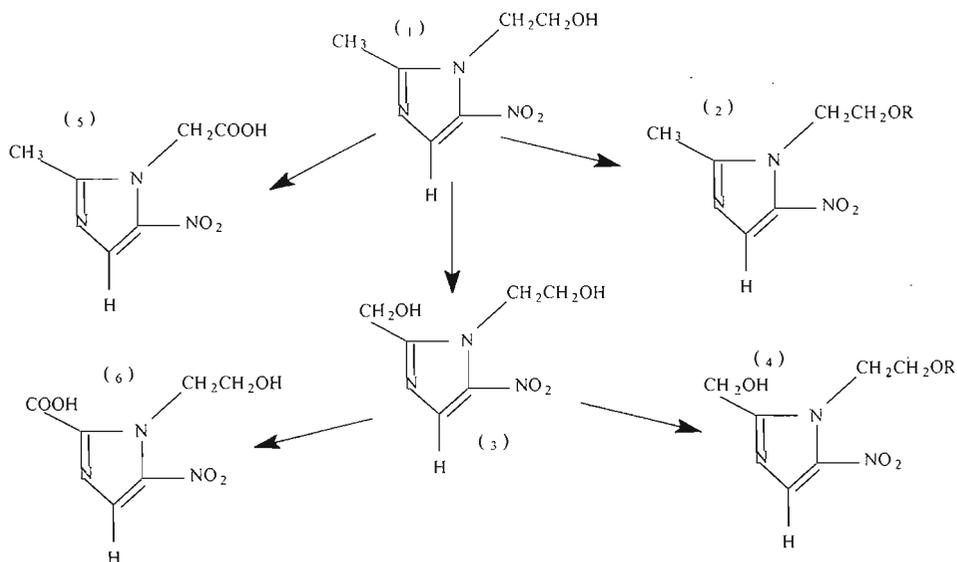


FIGURA 6 vías metabólicas del metronidazol en el organismo humano

Eliminación

La vida media de eliminación es aproximadamente de 8 a 10 horas y se elimina principalmente por vía renal.⁽¹⁾

3.5.4 Farmacodinamia

El mecanismo de acción de los nitroimidazoles se refleja en una toxicidad selectiva para los organismos anaeróbicos o microaerófilos y para las células anóxicas o hipóxicas.

El grupo nitro del metronidazol se comporta como un aceptor de electrones para las proteínas transportadoras de electrones, tales como las flavoproteínas en los tejidos de los mamíferos y las ferredoxinas o sus equivalentes en las bacterias. En el primer caso una nitrorreductasa cataliza la reacción del radical flavina con el compuesto nitro; en el último caso, la reducción es catalizada por complejos de hierro-azufre. La fuente de electrones para la reducción consiste en diversos sustratos endógenos reducidos, tales como el fosfato de nicotinamida adenina dinucleotido (NADPH) o el sulfuro. Se sabe que las formas reducidas químicamente reactivas del fármaco provocan lesiones bioquímicas que conducen a la muerte celular, algunos trabajos iniciales habían determinado que el fármaco inhibía la síntesis de ADN en *T. vaginalis* y *Clostridium bifermenetansi* causaba una degradación del ADN existente en estos últimos microorganismos. Actualmente estudios con el ADN en los mamíferos, indican que el metronidazol reducido con lleva a una pérdida de la estructura helicoidal del ADN, una ruptura de las cadenas y una alteración concomitante de su función. Estos hallazgos son coherentes con los efectos antimicrobianos y mutagénicos del metronidazol. ⁽¹⁾

3.5.5 Resistencia

La resistencia al metronidazol se ha estudiado normalmente en tricomonas, en cepas de laboratorio y en formas aisladas de seres humanos. Se han hallado mecanismos aerobios y anaerobios de resistencia. La resistencia anaeróbica al metronidazol, que hasta la fecha se observa solo en estudios de laboratorio efectuados en cepas de *T. vaginalis* y *T. foetus* expuestas a concentraciones crecientes del fármaco en el cultivo, al parecer es consecuencia de una disminución o ausencia de la actividad enzimática dentro del hidrogenosoma, organeolo peculiar que es el sitio de glucólisis en dichas bacterias. A diferencia de ello, las cepas de *T. vaginalis* aisladas de pacientes humanos y que son casos refractarios de

tricomonosis, muestran un tipo de resistencia aeróbica al metronidazol que se detecta solamente en presencia de oxígeno. Dichas cepas resistentes al medicamento contienen valores menores de ferredoxina, proteína que cataliza la reducción del metronidazol en dichos microorganismos. También muestran una disminución correspondiente en la velocidad de transcripción genética de ferredoxina en comparación con las cepas farmacosensibles. El hecho de que disminuyan los valores de ferredoxina pero sin que desaparezcan del todo, quizás explica por qué las infecciones con las cepas mencionadas suelen reaccionar a dosis mayores de metronidazol y ciclos mas duraderos con él.⁽¹⁾

3.5.6. Dosis y administración

El metronidazol es utilizado en el tratamiento de enfermedades genitourinarias causadas por *T. vaginalis*, en mujeres y varones, en un gran porcentaje de casos. El régimen terapéutico preferido incluye administrar 2 g de metronidazol en una dosis oral, tanto en varones como en mujeres. En personas que no toleran una sola dosis de 2g, otro régimen es tomar 250 mg tres veces al día durante siete días. Cuando se necesitan ciclos repetidos o dosis más altas del fármaco en infecciones no curadas o recurrentes, se recomienda dejar que transcurran intervalos de cuatro a seis semanas entre uno y otro ciclo terapéutico. En dichos casos, hay que efectuar cuantificaciones de leucocitos antes, durante y después de cada ciclo, para determinar el grado de afección celular.

El metronidazol es un amebicida eficaz y se ha vuelto el amebicida mas indicado para tratar todas las formas sintomáticas de amibiasis. Se recomienda que los enfermos reciban 750 mg de metronidazol tres veces al día, durante 5 a 10 días en todas las áreas geográficas y sin importar la virulencia del parásito o la forma de infección por combatir. La dosis diaria para niños es de 35 a 50 mg/kg de peso. en tres fracciones durante 10 días.

La administración de metronidazol es mucho menos eficaz cuando se proporciona a un individuo sintomático que expulsa quistes, tal vez por que en la parte superior de la vía gastrointestinal se absorbe el fármaco. No se ha confirmado la aparición de resistencia de *E. Histolytica* metronidazol a pesar del amplio uso de este compuesto en seres humanos.

El metronidazol se ha vuelto el fármaco más indicado contra la giardiasis aunque su empleo contra dicho microorganismo aun se considera de tipo experimental en USA. El régimen usual es de 250 mg tres veces al día, durante siete días para adultos y 5 mg/kg de peso tres veces al día, durante siete días en niños. También se ha utilizado con buenos resultados una dosis diaria de 2g durante tres días, para el tratamiento de infecciones graves por bacterias anaeróbicas sensibles que incluyen *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* y *Helicobacter*. El metronidazol también puede ser administrado por vía intravenosa, en las indicaciones antes mencionadas. El régimen recomendado por esa vía contra infecciones por anaerobios incluye una dosis inicial de 15 mg/kg de peso seguida, seis horas después, por otra de sostén de 7.5 mg/kg de peso cada seis horas, casi siempre en un lapso de cinco a siete días. ⁽¹⁾

3.5.7. Efectos adversos

Los efectos adversos del metronidazol están relacionados con la dosis. Los trastornos gastrointestinales más comunes son náuseas y un sabor metálico en la boca, las náuseas en ocasiones están acompañadas por dolor de cabeza, anorexia y vómito. Los efectos adversos solo en contadas ocasiones alcanzan intensidad suficiente para interrumpir el uso del fármaco. Los más comunes son cefaleas, náusea, xerostomía y un regusto metálico. A veces surgen molestias abdominales.

Durante la terapia puede presentarse la lengua rasposa, glositis y estomatitis. y estas se acompañan de una intensificación repentina de moniliasis. Entre los efectos

neurotóxicos que obligan a interrumpir el consumo de metronidazol se encuentran: mareo, vértigo y en raras ocasiones, encefalopatía, convulsiones, incoordinación y ataxia como efectos neurotóxicos. Es mejor interrumpir la administración del fármaco si surge insensibilidad o parestesias de las extremidades. La reversión de las neuropatías sensitivas graves puede ser lenta o incompleta. También se han señalado casos de urticaria, hiperemia facial, prurito, disuria, cistitis y una sensación de presión pélvica. ⁽¹⁾

3.5.8. Interacción con otros fármacos

El metronidazol posee un efecto similar al disulfiran, cuando se administra junto con alcohol, ya que se le presenta una reacción al individuo llamada efecto antabuse, los efectos que causa esta reacción son psicosis y confusión. Se tienen fármacos que pueden disminuir la concentración plasmática ya que aceleran el metabolismo de éste, como lo es la fenitoína y el fenobarbital. La cimetidina aumenta la concentración plasmática del metronidazol, lo que podría causar efectos neurológicos. ⁽⁸⁾

3.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de métodos analíticos se ha vuelto muy importante en nuestros días ya que mediante ella podemos asegurar que los resultados son confiables y seguros, por lo tanto una parte importante de este trabajo fue la validación del método analítico para lo cual se tomó como base la norma mexicana NOM-177-SSA1-1998 ⁽⁹⁾ en donde se definen los parámetros de validación de la siguiente manera:

Validación: Es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado.

Estabilidad de la muestra: Es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento de muestreo hasta su análisis.

Exactitud: Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Linealidad: es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

Límite de detección: Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra, el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación: Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Precisión: Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de la muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

Reproducibilidad intralaboratorio: Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días o analistas.

Rango: Es el intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Selectividad: Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Tolerancia: Es la capacidad de un método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

3.7. MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METRONIDAZOL EN TEJIDOS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS.

3.7.1. Métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

A. R. A. Márquez y cols. ⁽¹⁰⁾ proponen una técnica para la determinación de metronidazol y otros metabolitos en plasma y orina por CLAR, en la cual usan una columna μ Bondapak C₁₈ y una fase móvil que contiene 8% de acetonitrilo en solución amortiguadora de fosfatos 0.001M, pH = 4.0, la detección se realiza a 324 nm. Las muestras de suero y orina se precipitan con etanol y 20 μ L del sobrenadante se inyectaron en el equipo. El rango de concentración que se evaluó fue de 0.5 a 100 μ g/mL.

B. K Lanbeck y cols. ⁽¹¹⁾ propusieron un método para la determinación de metronidazol y tinidazol en plasma y heces por CLAR, usando para ello una columna Spherisorb S5 ODS, efectuando la detección a 320 nm, la fase móvil consistió en una mezcla al 15% de acetonitrilo en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH = 5.5, las muestras de plasma fueron extraídas usando éter o cloruro de metileno. El porcentaje de recobro fue del 90% y el rango de concentración evaluado fue de 1 – 16 μ g/mL.

- C. J. C. Jensen y R. Gugler⁽¹²⁾ proponen un método sensible para la determinación de metronidazol y sus metabolitos por CLAR, en el cual usan una columna μ bondapak C₁₈, con detección a 324 nm y una fase móvil de 0.005 M KH₂PO₄ pH=4.5 / metanol / tetrahidrofurano (82.6 : 16.5 : 0.9 v/v/v). Las muestras se precipitaron usando una solución de sulfato de zinc, el sobrenadante se inyectó al equipo. El rango de concentración fue de 1 – 40 μ g/mL.
- D. M. J. Galmier y cols.⁽¹³⁾ plantearon un método simple y sensible para la determinación de metronidazol en suero humano por CLAR, la columna usada fue LiChospher 100 RP 18, la fase móvil fue Acetonitrilo / solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH = 4.7 (15: 85 v/v) y una longitud de onda de 318 nm para la detección. De las muestras se tomó 1 mL se precipitaron las proteínas adicionando acetonitrilo, se agitó y centrifugó, se congelaron los tubos a -25°C la fase orgánica se evaporó, se reconstituyó con fase móvil y se inyectó en el equipo. El rango de trabajo fue de 0.01 a 10 μ g/mL.
- E. A. Menelaou y cols.⁽¹⁴⁾ desarrollaron un método para la cuantificación simultánea de metronidazol y amoxicilina en plasma por CLAR, usando un detector PDA y una columna Spherisorb ODS-2, la fase móvil consiste en acetonitrilo 24% en solución amortiguadora de fosfato de sodio (20 mM) pH = 2.1 y SDS (dodecil sulfato de sodio 0.8 mM), longitud de onda a 313 nm. Se precipitan las proteínas con metanol, se centrifugó y el sobrenadante se inyectó al equipo. El rango de concentración fue de 1-50 μ g/mL y el porcentaje de recobro fue de 98.7% para metronidazol a 10 μ g/mL.
- F. Yu-Hsing Tu y cols.⁽¹⁵⁾ desarrollaron un método en el cual, determinan la farmacocinética del metronidazol administrando el fármaco por vía intravenosa a

ratas macho. El metodo emplea una columna μ -Bondapak C₁₈ y como fase móvil metanol – carbonato de amonio al 0.1% (47:53 v/v) y una longitud de onda de 318 nm. Para la extracción se empleó acetato de etilo. El rango de concentración de trabajo fue de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$, con un 100% de recobro del plasma.

4. PARTE

EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se dividió en las siguientes partes:

1. Optimización del método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de metronidazol en plasma.
2. Validación del sistema
3. Validación del método analítico
4. Evaluación del efecto del género en la farmacocinética del metronidazol.

4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METRONIDAZOL EN PLASMA.

El método para cuantificar metronidazol en plasma se basó en los trabajos de K. Lanbeck y cols.⁽¹¹⁾, M. Galmier y cols.⁽¹³⁾ y A. Menelaou y cols.⁽¹⁴⁾

4.1.1. Material, reactivos y equipos

Sustancias de referencia:

Metronidazol sustancia de referencia secundaria 99.9% (lote: 991010).

Tinidazol sustancia de referencia secundaria 99.9% (lote: A5683).

Reactivos:

Acetonitrilo grado cromatográfico, J. T. Baker

Metanol grado cromatográfico, Mallinckrodt

Ácido tricloro acético R.A, J. T. Baker

Fosfato de sodio dibásico R.A, Mallinckrodt

Ácido ortofosfórico R. A, J. T. Baker

Hidróxido de sodio R. A, J.T. Baker

Agua grado cromatográfico.

Plasma humano con certificado de pruebas de grupo sanguíneo, factor Rh, VDRL y VIH procedente del banco de plasma del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNyN).

Equipos e Instrumentos:

Agitador Vortex Thermolyne Maxi Mix II

Balanza analítica Sartorius i – 1800

Microcentrifuga Eppendorf modelo 5415 C

Micropipetas Eppendorf de 15 – 100 μ L

Micropipetas Eppendorf de 500 – 1000 μ L

Potenciómetro Oakton pH/mV/ $^{\circ}$ C Meter pH 1000 Series

Repetidoras Eppendorf Repeater Plus

Sistema de filtración Millipore de 0.45 μ m

Sonicador Brasonic PC620

Cromatógrafo de líquidos Waters equipado con los siguientes módulos:

Detector de arreglo de diodos UV-VIS modelo 996

Inyector automático modelo 717 plus

Dos bombas isocráticas modelo 510

Paquete de integración Millenium 32

4.1.2. Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de fosfato dibásico de sodio 0.020 M pH=4.0

Pesar con exactitud 2.73g de fosfato de sodio dibásico, transferir a un matraz volumétrico de 1 litro, disolver con agua grado cromatográfico y llevar a volumen con el mismo disolvente. Esta solución contiene 0.0020 mol / L de fosfato de sodio dibásico.

Solución de ácido ortofosforico al 1 % (v/v)

Transferir 1 mL de ácido ortofosforico R.A a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua grado cromatográfico.

Solución de referencia de metronidazol 1000 µg/mL

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de metronidazol (Sust. Ref.), transferir a un matraz volumétrico de 10 mL disolver y llevar a volumen con metanol. Esta solución contiene 1000 µg/mL de metronidazol (solución A).

Solución de referencia de tinidazol 1500 µg/mL

Pesar con exactitud el equivalente a 15 mg de tinidazol (Sust. Ref.), transferir a un matraz volumétrico de 10 mL disolver y llevar a volumen con metanol. Esta solución contiene 1500 µg/mL de tinidazol (solución B).

Solución para evaluar el sistema

Tomar 1 mL de la solución A y depositarlo en un matraz volumétrico de 100 mL, tomar 1.5 mL de la solución B y depositarlo en el mismo matraz, llevar a volumen con metanol. Esta solución contiene 10 µg/mL de metronidazol y 22.5µg/mL de Tinidazol (Solución C).

Solución de referencia de tinidazol 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de tinidazol, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL disolver y llevar a volumen con metanol, esta solución contiene 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Solución D).

Solución de referencia de tinidazol 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Toma 500 μL de la solución D y transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL. llevar a volumen con metanol, esta solución contiene 50 μL de tinidazol (Solución E).

Solución de referencia de metronidazol 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol

Tomar 100 μL de la solución A y transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL. llevar a volumen con metanol, esta solución contiene 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de metronidazol (Solución F).

Solución de referencia de metronidazol 1000.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en plasma

Pesar con exactitud el equivalente a 100 mg de metronidazol (Sust. Ref.), transferir a un matraz volumétrico de 100 mL disolver con 2ml de metanol y llevar a volumen con plasma. Esta solución contiene 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de metronidazol (solución G)

4.1.3. Preparación de las curvas de calibración

Curva de calibración para la validación del sistema

Para la preparación de la curva de calibración se usaron las soluciones antes mencionadas así que su elaboración se resume en la tabla 1.

TABLA 1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE METRONIDAZOL (SISTEMA)

mL de solución de MTZ 1000 µg/mL (Solución A)	mL de solución de MTZ 10 µg/mL (Solución F)	µL de solución de E. I. 1000 µg/mL (Solución D)	Volumen final mL (metanol)	Concentración final de Metronidazol (µg/mL)
0.50	--	200	10.0	50.0
0.30	--	200	10.0	30.0
0.20	--	200	10.0	20.0
0.05	--	200	10.0	5.00
0.01	--	200	10.0	1.00
--	0.5	200	10.0	0.50

Curva de calibración para la validación del método

Para la preparación de la curva de calibración se usaron las soluciones antes mencionadas así que su elaboración se resume en la tabla 2.

TABLA 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE METRONIDAZOL (MÉTODO)

mL de solución de MTZ 1000 µg/mL (Solución G)	mL de Plasma	Concentración nominal de Metronidazol (µg/mL)
2.5	25.0	100.0
1.5	25.0	60.0
1.0	25.0	40.0
0.25	25.0	10.0
0.05	25.0	2.00
0.025	25.0	1.00

Nota: Empleando el método de extracción propuesto la concentración de metronidazol se diluye a la mitad debido a la adición del agente precipitante y el estándar interno.

4.1.4 Preparación de los puntos control

Para los puntos control se seleccionaron las concentraciones baja, media y alta que fueran diferentes a los puntos de la curva de calibración, pero que estuviesen contenidos en

el intervalo de la curva. La preparación y las concentraciones se muestran en las siguientes tablas 3 y 4.

Puntos control del sistema: La preparación y las concentraciones se muestran en la tabla 3.

TABLA 3. PUNTOS CONTROL (SISTEMA)			
mL de Solución A añadidos	μ L de Solución D añadidos	Volumen final (metanol)	Concentración final de Metronidazol (μ g/mL)
0.40	200	10.0	40.0 Alto
0.30	200	10.0	10.0 Medio
0.03	200	10.0	3.00 Bajo

Puntos control del método: La preparación y las concentraciones se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. PUNTOS CONTROL (MÉTODO)		
mL de solución de MTZ 1000 μ g/mL Solución G	mL de Plasma	Concentración de Metronidazol (μ g/mL)
2.00	25.0	80.0 Alto
0.50	25.0	20.0 Medio
0.15	25.0	6.00 Bajo

Nota: Empleando el método de extracción propuesto la concentración de metronidazol se diluye a la mitad debido a la adición del agente precipitante y el estándar interno.

4.1.5 Selección de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}).

Se realizó un barrido espectrofotométrico en el rango de 200 a 400 nm.

4.1.6. Elección de la columna cromatográfica.

Se probaron tres columnas de características semejantes a las empleadas en las referencias citadas, la elección se realizó en base a los parámetros cromatográficos tales como: tiempo de retención (t_r), factor de capacidad (k'), simetría y resolución entre picos, teniendo los siguientes criterios de aceptación.

- Tiempo de retención (t_r) de metronidazol y tinidazol correspondientes a un pico eluido en una área del cromatograma libre de picos endógenos
- Factor de capacidad $k' > 2$, como indicador del grado de retención de metronidazol y tinidazol entre la fase estacionaria y la fase móvil.
- Simetría ≤ 2.0 como un indicador de la deformación del pico.
- Resolución $R \geq 2.0$ como indicador del grado de separación entre dos picos cromatográficos

Las columnas evaluadas fueron:

- 1) Spherisorb ODS 2 $5\mu\text{m}$, 250 X 4.6 mm
- 2) Hipersyl HP $5\mu\text{m}$, 200 X 4.6 mm
- 3) Ultracarb 5 ODS, 150 X 4.6 mm

Las columnas fueron probadas empleando una concentración de metronidazol y tinidazol de 25 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$ en metanol respectivamente, a una proporción de fase móvil de acetonitrilo: solución amortiguadora de fosfatos 0.020 M pH=2.1 (24 / 76) a un flujo isocrático de 1.5 mL/min. Se inyectó un volumen de 20 μL .

4.1.7 Selección del estándar Interno (E. I.)

Se realizó una revisión bibliográfica para obtener el estándar interno que se ajustara a nuestras necesidades. Dicho estándar interno debía tener características fisicoquímicas, estructurales y un comportamiento espectrofotométrico similar al metronidazol, esto con la finalidad de tener respuestas semejantes al UV-Vis en ambos casos, y seguir cumpliendo con los parámetros cromatográficos tales como: resolución $R \geq 2.0$, factor de capacidad $k' \geq 2.0$, simetría ≤ 2.0 en la columna cromatográfica previamente elegida.

4.1.8. Optimización de la fase móvil

Para la elección de la fase móvil se tomó en cuenta que la resolución fuera mayor a 2, una simetría de picos ≤ 2 , garantizando una mejor separación de picos y una adecuada integración y cuantificación de los mismos.

4.1.9. Optimización del método de extracción

El método para extraer metronidazol de plasma seleccionado ⁽¹⁴⁾ consistía en una técnica de precipitación de proteínas, en la cual se variaron los agentes precipitantes para 100 μ L de plasma.

Los agentes precipitantes probados fueron los siguientes:

1. Metanol
2. Acetonitrilo
3. Acetona
4. Ácido perclórico 3.0 M
5. Ácido tricloroacético al 10%

El criterio de selección del método de extracción se enfocó en aquel que ofreciera una mayor recuperación, menor presencia de impurezas y repetibilidad en los resultados.

4.2. VALIDACIÓN DEL SISTEMA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METRONIDAZOL.

Una vez optimizado el método analítico y establecidas las condiciones analíticas, se procedió a validarlo para comprobar la confiabilidad de los resultados obtenidos, iniciando para ello con la validación del sistema, en donde se determinaron los parámetros de linealidad y precisión.

4.2.1. Adecuabilidad del sistema

Para evaluar la adecuabilidad del sistema cromatográfico se incluyó un punto de precisión. Esta solución se inyectó seis veces determinando el CV% de las áreas relativas de los picos de metronidazol y tinidazol, teniendo que ser menores al 2.0%, además también se determinó el CV% para los tiempo de retención teniendo que ser menor al 2%, asegurándose con esto la buena operación del equipo cromatográfico. La adecuabilidad del sistema se evaluó antes de cada corrida cromatográfica.

Para comprobar que tanto el sistema como el método analítico cumplen con el propósito para el que fue diseñado, este se validó siguiendo las especificaciones de la NOM-177-SSA1-1998⁽¹⁵⁾, en lo referente a la validación de métodos analíticos para realizar pruebas de bioequivalencia.

4.2.2. Linealidad y precisión del sistema

La linealidad del sistema se determinó preparando a partir de pesadas independientes, tres curvas de calibración de seis concentraciones diferentes.

De cada curva de calibración se determinó la relación de áreas (área de metronidazol / área de estándar interno) para cada punto, se graficó con respecto a la

concentración de metronidazol y se determinó por un ajuste de mínimos cuadrados: pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de correlación (r) y el error relativo debido a la regresión ($S_{y/x, r}$).

El sistema se considera lineal si el coeficiente de correlación es mayor de 0.99 y el error relativo debido a la regresión no es mayor que el 2%.

La precisión del sistema se evaluó a partir de los datos de linealidad, en donde el coeficiente de variación del factor de respuesta no debió ser mayor que el 2%.

Donde:

$$\text{Factor Respuesta (f)} = (\text{Relación de áreas} / \text{Concentración})$$

4.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN PLASMA

Los parámetros para evaluar el método se describen a continuación:

4.3.1. Linealidad del método

Para evaluar la linealidad del método se prepararon a partir de pesadas diferentes, tres curvas de calibración de seis concentraciones distintas de metronidazol en plasma. Las muestras se procesaron y se inyectaron de acuerdo al método propuesto. Para cada curva de calibración, se determinó: La relación de áreas (área de metronidazol / área de estándar interno) para cada punto, estas se graficaron con respecto a la concentración de metronidazol y se realizó un ajuste de mínimos cuadrados determinando: pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de correlación (r).

Para que el método sea lineal el coeficiente de correlación debiera ser mayor o igual a 0.99.

Los parámetros de precisión, exactitud, recuperación absoluta y estabilidad, se evaluaron tomando como controles bajo, medio y alto las concentraciones de 3.0, 10.0, y 40.0 µg/mL.

4.3.2. Precisión

La precisión del método se evaluó con los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad, analizando tres concentraciones conocidas de metronidazol en plasma controles bajo, medio y alto, las cuales difieren de las curvas de calibración pero se incluyen en el intervalo de concentraciones.

Para el parámetro de repetibilidad los tres niveles de concentración se analizaron en un mismo día y por quintuplicado, y para la reproducibilidad intralaboratorio se analizaron por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta.

El criterio de aceptación fue que el coeficiente de variación para cada nivel de concentración no fuera mayor al 15%.

4.3.3. Exactitud

La exactitud se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales de cada nivel, con respecto a la concentración nominal de la muestra.

$$\% \text{ Desviación Absoluta} = \left\{ \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración promedio recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \right\} \times 100$$

El valor promedio de las determinación en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad debera estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

4.3.4. Recuperación absoluta

Se prepararon tres series de concentraciones de metronidazol en plasma y tres series de concentraciones de metronidazol en metanol, conteniendo tinidazol como estándar interno a concentraciones equivalentes. Los valores de concentración alto, medio y bajo de metronidazol fueron diferentes a los de la curva de calibración pero dentro del intervalo de concentraciones. Las muestras plasmáticas fueron procesadas e inyectadas de acuerdo al método propuesto, en tanto que las muestras en metanol fueron inyectadas directamente al cromatógrafo. Se compararon las relaciones de áreas metronidazol/estándar interno obtenidas en plasma, con respecto a las obtenidas en metanol para cada concentración. El porcentaje de recobro no deberá ser necesariamente del 100%, pero si reproducible en cada nivel de concentración y la desviación absoluta del valor de recuperación individual con respecto al promedio no deberá ser mayor al 15%.

4.3.5. Límite de cuantificación

Se preparó por quintuplicado la concentración mas baja del intervalo de trabajo. Se consideró que el punto tenía validez como límite de cuantificación si el valor promedio de las cinco repeticiones caían dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor de 20%.

4.3.6. Límite de detección

Se determinó la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés (en proporción 3:1).

4.3.7. Estabilidad

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que el metronidazol permanece estable en plasma, durante su manejo, almacenamiento y

procesamiento. Para que el compuesto de interés se considere estable en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deberán de estar dentro del $\pm 15\%$ del valor promedio al tiempo cero de concentración y el coeficiente de variación no debía ser mayor que 15%.

Para ello se evaluó la respuesta por muestras preparadas por duplicado a tres niveles de concentración (alto, medio y bajo) dentro del intervalo de trabajo, bajo las siguientes condiciones:

4.3.7.1. Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente

Se prepararon 2.5 mL de cada control bajo, medio y alto por duplicado de metronidazol, los cuales se procesaron y se inyectaron de acuerdo al método de extracción propuesto.

Se conservó el volumen restante de las muestras plasmáticas a temperatura ambiente para procesarlas e inyectarlas nuevamente a las 12 y 24 horas de permanecer a esta temperatura.

4.3.7.2. Estabilidad de las muestras en congelación (-70°C).

La estabilidad de las muestras en congelación a largo plazo se evaluó utilizando los puntos control de metronidazol en plasma, que se congelaron a -70°C y posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente a los 7 y 15 días después de su preparación. Las muestras plasmáticas se procesaron de acuerdo al método de extracción propuesto.

4.3.7.3. Estabilidad de las muestras en refrigeración a 5°C.

Se evaluó la estabilidad de metronidazol usando los puntos control alto, medio y bajo de metronidazol en plasma, los cuales se procesaron y mantuvieron en refrigeración a 5°C . Las muestras procesadas se inyectaron a 0, 7 y 14 días posteriores a su tratamiento.

Las muestras plasmáticas fueron procesadas y analizadas de acuerdo al método propuesto.

Los valores de concentración recuperada se obtuvieron introduciendo sus respectivos valores de relación de áreas. en la ecuación de la recta, derivada de la regresión lineal por mínimos cuadrados, de la curva de calibración procesada y analizada el mismo día de su análisis.

4.3.8. Selectividad

Se determinó la selectividad del método al analizar muestras blanco de plasma, provenientes de las ratas en estudio y muestras de fármacos de uso común, sometidas al procedimiento de extracción propuesto. Para que el método cumpla con esta prueba no debían existir interferencias en la cuantificación de metronidazol.

4.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL GÉNERO EN LA FARMACOCINÉTICA DEL METRONIDAZOL.

El estudio se llevo a cabo en el Laboratorio de Farmacología del edificio de investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM.

4.4.1. Selección de los animales de estudio:

En este estudio se usaron 12 ratas Wistar de sexo macho y hembra, que cubrían los siguientes requisitos:

- Ratas Wistar hembras y machos de peso entre 250 – 300 gr.
- Sanas, color de pelo blanco
- De edad entre 4 y 5 meses de vida
- No haberse usado para algún otro estudio

- Libres de parásitos intestinales
- De preferencia de una misma camada o de mismos congéneres

4.4.2. Diseño experimental:

Para este estudio se eligieron dos grupos de 6 ratas cada uno, 6 machos y 6 hembras, los cuales fueron asignados al azar a dos grupos de acuerdo a un diseño paralelo.

A ambos grupos se les administro por vía oral, una dosis única de 25 mg/kg de peso de metronidazol en suspensión (Flagyl de 250 mg Laboratorios Liomont, lote: 25684)

4.4.3. Protocolo experimental

Durante el periodo de estudio las ratas se prepararon de la siguiente manera:

1. Se mantuvieron a las ratas en ayuno por lo menos 12 horas antes del estudio.
2. Durante el estudio se mantuvieron en experimentación 6 ratas hembra un día y 6 ratas macho otro día
3. Previo a la administración de la dosis de metronidazol a cada rata se le tomó una muestra sanguínea como blanco.
4. Se administró una dosis única de metronidazol (25 mg/kg de peso) a cada rata por vía oral.
5. Dos horas después de la administración del medicamento se les permitio la ingesta de agua y alimento durante 30 minutos. Diez horas después de la ingesta del medicamento, el agua y el alimento se les proporcionó *ad libitum*.
6. Se obtuvieron 500 μ L de sangre, obtenida a través de la conjuntiva ocular con ayuda de un tubo capilar heparinizado.
7. Los tiempos de toma de muestras sanguíneas fueron los siguientes: 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 24.0, 27.0 y 30.0 horas después de la administración

- del fármaco, comenzando la administración de metronidazol a las 09:00 hrs del día correspondiente.
8. Cada muestra sanguínea fue depositada en un microtubo eppendorf heparinizado previamente etiquetado con la identificación de la rata y hora de toma de muestra.
 9. Se separó el plasma por centrifugación y se almacenó a -75°C hasta el momento de su análisis.
 10. Cada rata estaba en sus cajas de plástico limpias, manteniéndose bajo ciclos de luz/oscuridad a temperatura ambiente y con iluminación artificial.

4.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS PLASMÁTICAS

Las muestras plasmáticas se analizaron utilizando el método por cromatografía de líquidos de alta resolución previamente desarrollado y validado.

El análisis de muestras se llevó a cabo de acuerdo a un plan de trabajo previamente revisado y aprobado. Este plan de trabajo establece que las muestras de seis ratas se analizarían en un mismo día. Cada corrida estaría constituida de una curva de calibración de 6 concentraciones diferentes y muestras plasmáticas provenientes de ratas Wistar, además de los puntos control (bajo, medio, alto) por duplicado.

4.5.1 Puntos control de calidad

Para el control de calidad de la corrida cromatográfica se colocó una muestra control por duplicado cada 8 muestras problema.

El criterio empleado para aceptar una corrida analítica fue que 2 de 6 muestras control, que no sean de la misma concentración, pueden estar fuera de $\pm 20\%$ de la concentración nominal respectiva.

4.5.2 Cuantificación de las muestras plasmáticas

La determinación de la concentración de metronidazol en las muestras plasmáticas analizadas, se determinó empleando los valores de relación de áreas (área del pico de metronidazol / área del pico de tinidazol) en la ecuación de la recta de la curva de calibración correspondiente, generada por un ajuste de mínimos cuadrados.

Cabe señalar que aquellas muestras que estuvieron por debajo del intervalo de calibración no se incluyeron en los cálculos finales.

Para el seguimiento del método durante el análisis de las muestras problema, se demostró la consistencia de las curvas de calibración con respecto a la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de regresión en cada día de análisis. Las muestras control debieron cumplir con los criterios de precisión y exactitud establecidos en la validación del método.

4.5.3. Análisis farmacocinético

A partir de los datos obtenidos, se graficaron los perfiles de concentración plasmática vs tiempo de muestreo y se obtuvieron, para cada rata, los parámetros farmacocinéticos de área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración a tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo (ABC_{0-t}), el área bajo la curva de concentración plasmática de tiempo cero hasta tiempo infinito (ABC_{0-inf}), la concentración plasmática máxima (C_{max}), el tiempo en el cual se alcanza la concentración plasmática máxima (T_{max}) y el tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$), utilizando para ello el paquete computacional Biopak.

- El (ABC_{0-t}), se calculó por el método trapezoidal, dividiendo la curva de concentración plasmática contra tiempo en tantos trapecios como datos de

concentración plasmática se obtuvieran, se determinó el área de cada trapecio y los datos obtenidos se sumaron.

- El ABC_{0-inf} , se estimó sumando el ABC_{0-t} mas el cociente del último dato de concentración plasmática medido y la pendiente terminal beta.
- C_{max} y T_{max} se obtuvieron directamente de la curva de concentración plasmática con respecto al tiempo.
- La constante de eliminación (K_e) se determino mediante un ajuste logarítmico lineal por mínimos cuadrados, de la porción terminal de las curvas de concentración plasmática contra tiempo.
- El tiempo de vida media $t_{1/2}$ se determino usando la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = (\ln 2) / K_e$$

4.5.4. Análisis estadístico

Para comprobar o descartar el efecto del género en la farmacocinética del metronidazol en ratas, se compararon los parámetros farmacocinéticos obtenidos tanto para ratas macho como para ratas hembra, se empleo una prueba de “t - student“ y “ANADEVA” no pareada.

En los casos donde la distribución de los datos no diera cumplimiento a las pruebas de normalidad e igualdad de varianza, se aplicaran pruebas estadísticas no paramétricas como la prueba de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis usando para ello el paquete computacional SigmaStat.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO POR CLAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METRONIDAZOL EN PLASMA

5.1.1 Selección de la longitud de onda

En la figura 7 se muestran los espectros de absorción ultravioleta de metronidazol y tinidazol, en los cuales se observa que el máximo de absorción es de 318 nm para ambos compuestos. Cabe señalar que a 318 nm se obtuvieron mejores respuestas para alturas y áreas de los picos de interés.

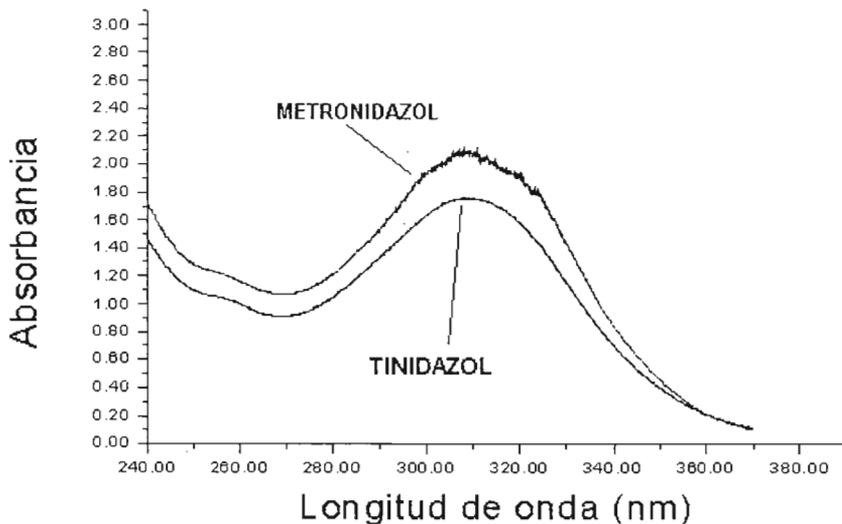


FIGURA 7. Espectro de absorción de metronidazol y tinidazol

5.1.2 Elección de la columna cromatográfica

La columna de nuestra elección fue una: Ultracarb 5 ODS 150 x 4.6 mm. de diámetro interno y 5µm de tamaño de partícula. Con ella los cromatogramas presentaron

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

una resolución mayor a 5.0 entre los picos de interés y los tiempos de retención fueron metronidazol : 3.0min y tinidazol : 5.8min; además la simetría fue de 1.10.

5.1.3. Selección del estándar interno

El estándar interno que se ajusto a los requisitos establecidos fue el tinidazol.

5.1.4. Optimización de la fase móvil

La fase móvil mas adecuada para nuestros fines fue una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfatos (NaH_2PO_4) 0.020M en una proporción 16:84 v/v, pH=4.00.

Las condiciones cromatográficas finales para el análisis de las muestras se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
Detector	PDA (Arreglo de diodos)
Longitud de onda	318 nm
Columna	Ultracarb 5 ODS 150 x 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μm
Precolumna	$\mu\text{Bondapack}$
Fase móvil	Acetonitrilo / Soluc. amort. de fosfatos pH = 4.0 (16 : 84 v/v) en forma isocrática
Velocidad de flujo	1.5 mL/min.
Volumen de inyección	20 μL

Con las condiciones cromatográficas previamente establecidas se obtuvieron los siguientes parámetros cromatográficos tanto para metronidazol como para el estándar interno y se muestran en la tabla 6.

TABLA 6. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS ÓPTIMOS							
METRONIDAZOL				TINIDAZOL			
tr (min)	k'	Simetría	Resolución	tr (min)	k'	Simetría	Resolución
3.00	2.61	1.13	--	5.80	6.52	1.12	6.60

El tiempo de corrida fue de 8.5 min y se puede observar que el factor de capacidad en ambos casos fue mayor a 2 lo que indica que tenemos un grado de retención de metronidazol y tinidazol entre la fase estacionaria y la fase móvil aceptable. Así mismo observamos que la simetría de los picos es menor a 2 lo que indica la poca deformación de los picos, de igual forma la resolución que presenta el estándar interno es mayor a 2 lo que indica que ambos picos están perfectamente separados.

5.1.5. Optimización del método de extracción

El método para extraer el metronidazol del plasma consiste en una técnica de precipitación de proteínas que nos ofrece una mejor recuperación, menor presencia de impurezas, por lo que cumple perfectamente los criterios de aceptación, además tiene las siguientes ventajas con respecto a lo reportado en la literatura consultada: volúmenes muy pequeños de muestra biológica (100 µL) y por lo tanto una menor generación de desechos biológico infecciosos, tiempos cortos de procesamiento de muestras dando lugar a un método sencillo, rápido y sobre todo económico.

El método de extracción optimizado se muestra en la figura 8.

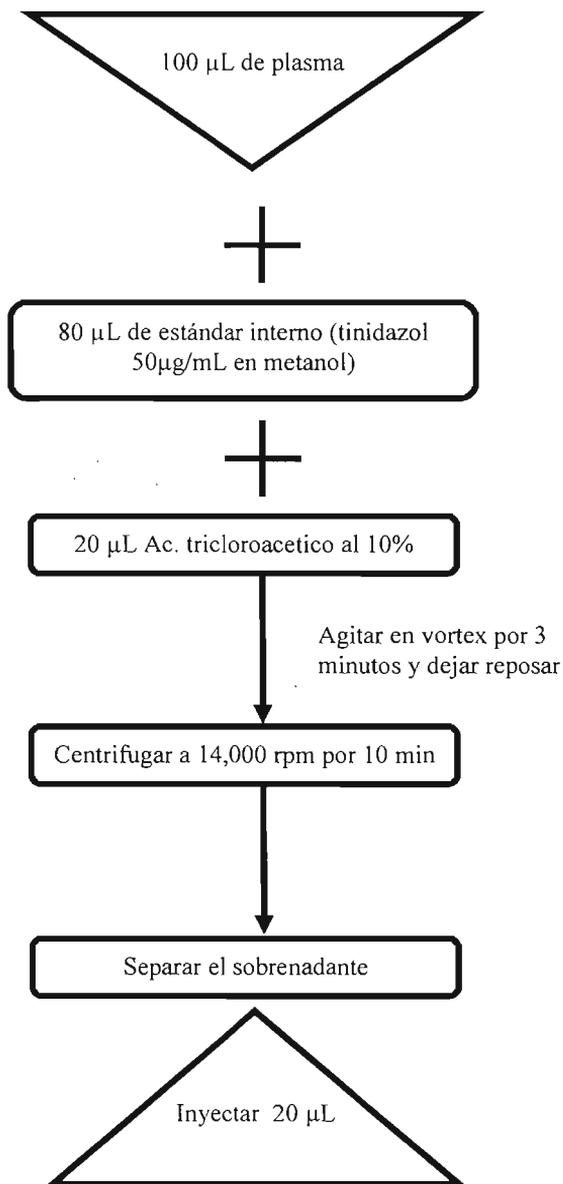


Figura 8. Método de extracción de metronidazol del plasma

5.2. VALIDACIÓN DEL SISTEMA PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN PLASMA

5.2.1. Linealidad y precisión del sistema

Para disminuir la variabilidad durante el procesamiento de extracción para la cuantificación de metronidazol, se decidió utilizar como estándar interno al tinidazol, caracterizando la relación de áreas entre metronidazol / tinidazol.

En la tabla 7 se muestran los resultados de linealidad y precisión del sistema.

concentración (µg/mL)	Curva 1 Rel. Areas	Curva 2 Rel. Areas	Curva 3 Rel. Areas
0.5	0.0187	0.0188	0.0187
1.0	0.0360	0.0363	0.0371
5.0	0.1976	0.1956	0.1956
20	0.7538	0.7493	0.7701
30	1.1510	1.1476	1.1535
50	1.8938	1.8911	1.8709
m	0.0397	0.0379	0.0376
b	0.0020	0.0010	0.0072
r	0.9999	0.9999	0.9998
Error relativo debido a la regresión	0.9642	1.1067	1.6935

Como se puede observar las tres curvas presentaron un coeficiente de correlación (r) mayor a 0.99 y un error relativo debido a la regresión menor a 2.0 % por lo que el sistema es lineal en el intervalo de 0.5 a 50.0 µg/mL.

En la figura 9 se presentan los resultados gráficos.

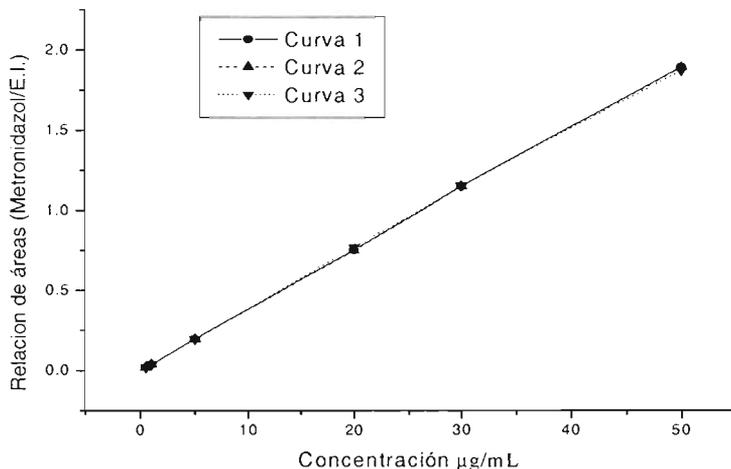


FIGURA 9. Linealidad del sistema

En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos para la precisión del sistema.

Tabla 8. PRECISIÓN DEL SISTEMA			
Concentración (µg/mL)	Curva 1 Factor respuesta	Curva 2 Factor respuesta	Curva 3 Factor respuesta
0.5	0.0374	0.0376	0.0374
1.0	0.0360	0.0363	0.0371
5.0	0.0387	0.0385	0.0383
20	0.0377	0.0375	0.0385
30	0.0384	0.0383	0.0385
50	0.0379	0.0378	0.0374
Promedio	0.0377		
Desviación estándar	0.0007522		
%CV	1.9934		

C.V. = coeficiente de variación

Como se puede visualizar en la tabla 8 el coeficiente de variación determinado partir de las 3 curvas no fue mayor al límite del 2.0%, la desviación estándar presentada fue de 0.0007522, lo que indica la precisión del mismo.

Por lo anterior el sistema es lineal y preciso en el intervalo de concentración de 0.5 a 50.0 $\mu\text{g/mL}$.

5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN PLASMA

Una vez realizada la validación del sistema para cuantificar metronidazol, el siguiente paso fue validar el método analítico. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

5.3.1. Linealidad del método

Para realizar la cuantificación de metronidazol en plasma, se uso la relación de áreas de los picos. El rango de concentraciones empleado para evaluar la linealidad fue: 0.5, 1.0, 5.0, 20.0, 30.0 y 50.0 $\mu\text{g/mL}$ de metronidazol.

En la tabla 9 se presentan los valores de pendiente (m), intercepto (b), coeficiente de correlación (r), obtenidos a partir de los cálculos de regresión lineal, para las curvas de calibración de metronidazol. Se puede observar que el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99, lo que indica que el método analítico es lineal en el intervalos de concentración de 0.5 a 50.0 $\mu\text{g/mL}$.

concentración (µg/mL)	Curva 1 Rel. Areas	Curva 2 Rel. Areas	Curva 3 Rel. Areas
0.5	0.01752	0.01707	0.01552
1.0	0.03490	0.03310	0.03211
5.0	0.15375	0.18297	0.15597
20	0.69151	0.65128	0.62058
30	1.03492	0.93284	0.98983
50	1.77939	1.66107	1.68578
m	0.0355	0.0327	0.0336
b	-0.0119	-0.0005	-0.0135
r	0.9998	0.9992	0.9995

En la figura 10 se presenta la gráfica de la relación de áreas promedio con respecto a la concentración de metronidazol, lo que demuestra gráficamente que el método fue lineal en el intervalo de concentración de 0.5 a 50 µg/mL con un valor de $r = 0.9997$.

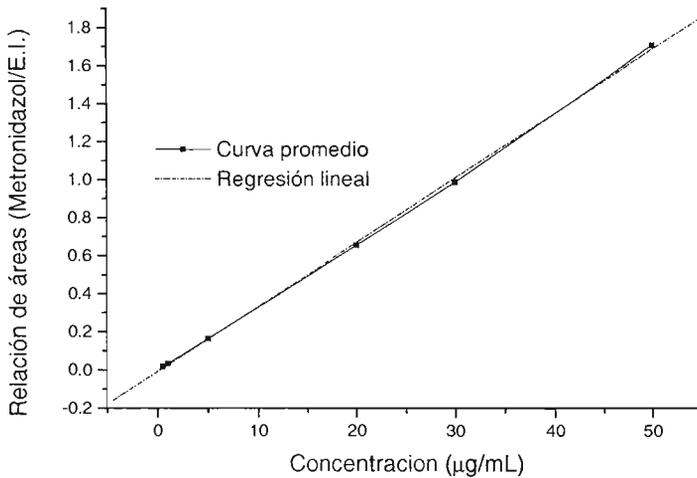


FIGURA 10. Linealidad del método.

5.3.2. Repetibilidad y exactitud interdia

Los resultados de la prueba de repetibilidad del método se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. REPETIBILIDAD Y EXACTITUD INTRADIA			
Conc. Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	3.0	10.0	40.0
REPLICA	CONCENTRACIÓN RECUPERADA ($\mu\text{g/mL}$)		
1	2.68	9.44	41.28
2	2.71	9.18	41.04
3	2.76	9.60	40.15
4	2.71	9.76	39.76
5	2.64	9.78	40.25
Promedio	2.70	9.55	40.49
D. E.	0.0395	0.2229	0.5714
% C. V.	1.46	2.33	1.41
% Desv Abs	10.00	4.50	1.23

El coeficiente de variación para los tres niveles de concentración se encontró en el rango de 1.41 - 2.33% valores muy por debajo del límite que es del 15%, mientras que la desviación absoluta no fue mayor a 15%.

5.3.3. Reproducibilidad y exactitud interdia

En la tabla 11 se muestran los resultados para la reproducibilidad.

Tabla 11. REPRODUCIBILIDAD				
Conc. Nominal (µg/mL)		3.0	10.0	40.0
DIA	REPLICA	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (µg/mL)		
1	1	2.71	9.76	40.15
	2	2.71	9.78	40.25
	3	2.76	9.60	39.76
2	1	2.95	9.92	40.07
	2	2.87	9.90	40.22
	3	2.79	9.77	41.22
3	1	2.61	9.90	40.12
	2	2.62	9.58	40.50
	3	2.66	9.49	39.05
Promedio		2.74	9.74	40.14
D. E.		0.1137	0.1557	0.5757
% C. V.		4.15	1.60	1.43
% Desv Abs		8.67	2.60	0.35

En la tabla 11 se puede observar que el coeficiente de variación (C.V.) para los datos obtenidos a lo largo de tres días de análisis, no fue mayor al 4.15% y el % desviación absoluta fue menor a 8.70%, por lo que se considera que el método es preciso y exacto.

5.3.4. Recuperación relativa

En la tabla 12 se muestran los resultados de porcentaje de recobro para metronidazol en plasma.

**TABLA 12. RECOBRO RELATIVO DE
METRONIDAZOL (RELACIÓN DE ÁREAS)**

CONCENTRACIÓN							
	3.0 µg/mL		10.0 µg/mL		40.0 µg/mL		PROMEDIO
	PLASMA	METANOL	PLASMA	METANOL	PLASMA	METANOL	
	0.1003	0.0995	0.3555	0.3510	1.4747	1.3837	
	0.1006	0.0996	0.3239	0.3455	1.3738	1.3982	
	0.0999	0.1037	0.3413	0.3426	1.4457	1.3541	
PROMEDIO	0.1003	0.1009	0.3401	0.3463	1.4316	1.3786	
% RECOBRO	99.34		98.20		103.85		100.46
% DESVIACIÓN ABSOLUTA	0.66		3.52		4.06		2.75

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

La recuperación promedio en este caso fue de 100.76% manteniéndose constante a lo largo del rango de trabajo y con una desviación absoluta promedio de 3.45.

5.3.5. Limite de cuantificación y detección

Tabla 13. LIMITE DE CUANTIFICACIÓN			
Conc. Nominal (µg/mL)	0.10	0.25	0.50
REPLICA	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (µg/mL)		
1	0.0161	0.1684	0.4721
2	0.0154	0.1992	0.4146
3	0.0212	0.1897	0.4131
4	0.0374	0.1695	0.4634
5	0.0308	0.1911	0.4174
Promedio	0.0242	0.1836	0.4361
D. E.	0.01	0.01	0.03
% C. V.	35.56	6.75	5.96
% Desv Abs	75.83	26.57	12.78

Se considero 0.5 µg/mL como la cantidad mínima cuantificable, ya que fue la concentración mas baja que presento un coeficiente de variación y una desviación absoluta menor al 20% (C. V. = 5.96% y desviación absoluta = 12.78%) cumpliendo el criterio para la exactitud y precisión del método. Cabe señalar que para la concentración 0.250 µg/mL el CV es menor del 15% pero la desviación absoluta es mucho mayor al límite que es del $\pm 20\%$. por lo que se descarta como limite de cuantificación.

El valor para el límite de detección fue de 0.250µg/mL ya que pudo distinguirse de los niveles de ruido en proporción 3:1.

5.3.6. Estabilidad

5.3.6.1. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de muestras procesadas en plasma y mantenidas a temperatura ambiente durante 12 y 24 horas.

Tabla 14. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A TEMPERATURA AMBIENTE			
0 Hrs			
	Control Bajo 3.0 µg/mL	Control Medio 10.0 µg/mL	Control Alto 40.0 µg/mL
	2.93	10.26	41.83
	2.90	10.15	41.68
Promedio	2.91	10.21	41.76
12 Hrs			
	Control Bajo 3.0 µg/mL	Control Medio 10.0 µg/mL	Control Alto 40.0 µg/mL
	2.89	10.19	41.48
	2.85	11.87	39.23
Promedio	2.87	11.02	40.36
Desv. abs%	1.54	8.08	3.35
24 Hrs			
	Control Bajo 3.0 µg/mL	Control Medio 10.0 µg/mL	Control Alto 40.0 µg/mL
	2.87	11.85	38.96
	2.84	11.81	39.04
Promedio	2.86	11.83	39.00
Desv. abs%	3.89	13.74	7.06

En la tabla anterior se puede observar que la desviación absoluta a los tiempos 12 y 24 horas es menor al 15%, por lo que las muestras procesadas son estables a temperatura ambiente por un periodo de hasta 24 horas.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.3.6.2. Estabilidad de las muestras en congelación (-70°C)

En la tabla 15 se muestran los resultados de la cuantificación de las muestras bajo ciclos de congelación y descongelación. Se puede observar que la desviación absoluta a los 7 y 14 días es menor al 15%, por lo que las muestras procesadas son estables bajo ciclos de congelación y descongelación durante 14 días.

Tabla 15. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN CONGELACIÓN (-70°C).			
0 días			
	Control Bajo 3.0 µg/mL	Control Medio 10.0 µg/mL	Control Alto 40.0 µg/mL
	2.93	10.26	41.83
	2.90	10.15	41.68
Promedio	2.92	10.21	41.76
7 días			
	Control Bajo 3.0 µg/mL	Control Medio 10.0 µg/mL	Control Alto 40.0 µg/mL
	3.18	10.08	40.38
	3.18	10.06	40.77
Promedio	3.18	10.07	40.58
Desv. abs%	9.09	1.32	2.83
14 días			
	Control Bajo 3.0 µg/mL	Control Medio 10.0 µg/mL	Control Alto 40.0 µg/mL
	2.80	9.83	39.73
	2.73	9.82	39.96
Promedio	2.77	9.83	39.85
Desv. abs%	1.65	3.87	4.79

5.3.6.3. Estabilidad de las muestras en refrigeración

En la tabla 16 se muestran los resultados que corresponden a la cuantificación de las muestras mantenidas en refrigeración por un periodo de 7 y 14 días. Se observa que la desviación absoluta para 7 y 14 días no es mayor al 15 % por lo que las muestras procesadas en refrigeración son estables por un periodo de 14 días.

Tabla 16. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN REFRIGERACIÓN			
0 días			
	Control Bajo 3.0 µg/mL	Control Medio 10.0 µg/mL	Control Alto 40.0 µg/mL
	2.93	10.26	41.83
	2.90	10.15	41.68
Promedio	2.92	10.21	41.76
7 días			
	Control Bajo 3.0 µg/mL	Control Medio 10.0 µg/mL	Control Alto 40.0 µg/mL
	3.19	9.85	40.25
	3.20	9.88	40.14
Promedio	3.20	9.87	40.20
Desv. abs%	9.42	3.38	3.75
14 días			
	Control Bajo 3.0 µg/mL	Control Medio 10.0 µg/mL	Control Alto 40.0 µg/mL
	2.70	9.49	39.90
	2.68	9.67	40.40
Promedio	2.69	9.58	40.15
Desv. abs%	8.55	6.58	4.01

Resumiendo los resultados tenemos: El metronidazol procesado en plasma fue estable durante 24 horas a temperatura ambiente, mientras que en refrigeración fue estable por 14 días de igual forma el fármaco fue estable después de someterlo a 2 ciclos de congelación / descongelación ya que el coeficiente de variación y la desviación absoluta en cada nivel de concentración no rebaso el 15% del valor de la muestra original.

5.3.7. Selectividad

En la figura 11 se observa que la mezcla de la matriz biológica con heparina y matriz biológica con Aspirina no interfiere en la respuesta cromatografica de metronidazol.

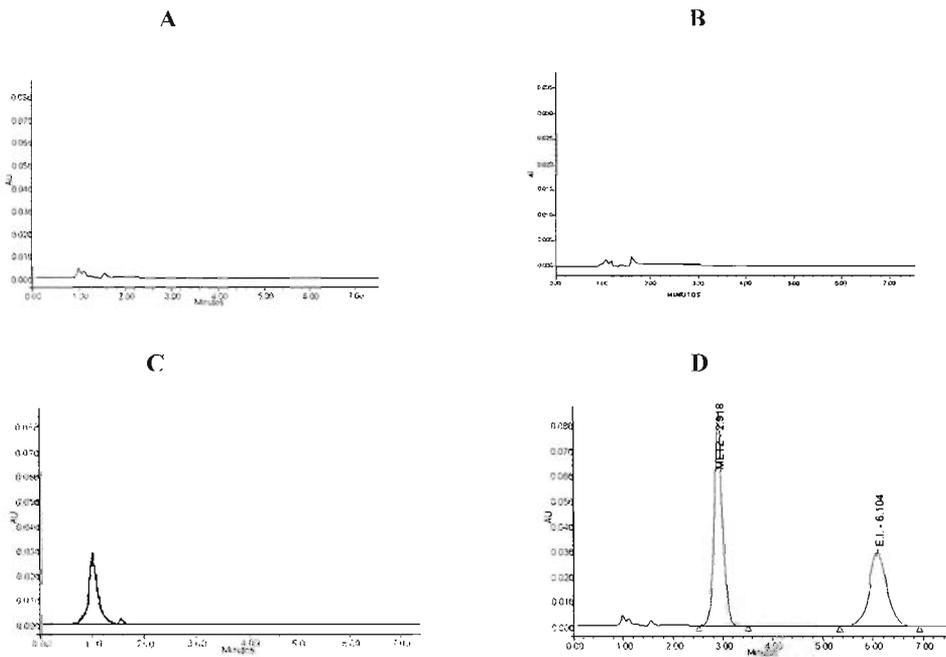


FIGURA 11 Selectividad del método: A) Matriz biológica, B) Anticoagulantes (heparina) C) Fármacos de uso común (Aspirina) D) Cromatograma típico de una muestra.

De acuerdo a los resultados obtenidos la heparina y la aspirina no interfieren con la señal del metronidazol por lo que el método analítico es selectivo para los compuestos analizados en plasma y aplicable para realizar estudios farmacocinéticos.

La sensibilidad proporcionada por la detección en UV, el tiempo de corrida cromatográfica, la resolución y simetría alcanzadas para los picos de interés y la sencillez, rapidez del método de extracción, son características que hacen al método analítico adecuado para el análisis rutinario de muestras, y para el monitoreo de metronidazol en otras aplicaciones, incluyendo estudios farmacocinéticos en otras especies

5.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL GÉNERO EN LA FARMACOCINÉTICA DEL METRONIDAZOL EN RATAS WISTAR.

Una vez desarrollado y validado el método analítico, se realizó la evaluación del efecto del género en la farmacocinética del metronidazol en ratas Wistar, 6 hembras y 6 machos.

Como se señaló en la parte experimental, cada corrida analítica comprendió el análisis de las muestras de seis ratas y de su curva de calibración correspondiente, así como los puntos de control de calidad, contando al final con dos corridas analíticas. Los resultados del seguimiento de las curvas de calibración de cada uno de los días de análisis se muestran en la tabla 17, en la que se puede observar que las curvas de calibración mostraron poca variación entre los puntos de concentración, obteniendo un coeficiente de variación menor a 15% con respecto al valor nominal, además el coeficiente de correlación (r) es mayor al 0.99 por lo que las curvas empleadas son confiables.

Tabla 17. SEGUIMIENTO DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

Conc. Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	RELACIÓN DE ÁREAS OBTENIDAS		PROMEDIO	D. E.	% C V
	1	2			
0.5	0.0183	0.0181	0.0182	0.00	0.78
1.0	0.0352	0.0357	0.0355	0.00	1.00
5.0	0.1880	0.1873	0.1877	0.00	0.26
20.0	0.7323	1.0628	0.7457	0.02	2.53
30.0	1.1393	1.0628	1.1011	0.05	4.91
50.0	1.8091	1.7730	1.7911	0.03	1.43
b	0.0060	0.0103	0.0081		
m	0.0365	0.0354	0.0360		
r	0.9996	0.9996	0.9998		

Los resultados de los puntos de control de calidad, se muestran en la tabla 18. en la que se observa que todos los controles cumplieron con el criterio de aceptación empleado para aceptar una corrida analítica que fue 2 de 6 muestras control, que no sean de la misma concentración, pueden estar fuera de $\pm 20\%$ de la concentración nominal respectiva, por lo tanto las corridas analíticas son confiables.

Tabla 18. CONTROLES DURANTE LA CORRIDA

CORRIDA	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
	CONCENTRACIÓN RECUPERADA ($\mu\text{g/mL}$)		
1	2.93	10.26	41.83
	2.90	10.15	41.68
2	2.85	11.87	39.23
	2.87	11.85	38.96
Promedio	2.8757	11.0217	40.3700
D. E.	0.0326	0.9010	1.4238
% C. V.	1.1332	8.1747	3.5269
% DESV ABS	4.14	10.22	0.92

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los valores promedio de concentración plasmática de metronidazol tanto para ratas hembra como macho se presentan en la tabla 19 y su grafica correspondiente en la figura 13. Los datos de concentración plasmática para cada rata y sus respectivas gráficas presentan en el apéndice I.

Dado que en los últimos tiempos de muestreo las concentraciones fueron menores al limite de cuantificación no se incluyeron para los cálculos.

Tabla 19. VALORES DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA PROMEDIO DE METRONIDAZOL CON RESPECTO AL TIEMPO Y GÉNERO

TIEMPO	RATAS HEMBRA	RATAS MACHO
	Conc plasmática ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm D. E.	Conc plasmática ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm D. E.
0.0	0.0	0.0
0.5	3.4950 \pm 2.41	3.7983 \pm 3.09
1.0	5.5817 \pm 4.15	5.6950 \pm 3.96
2.0	8.4850 \pm 5.47	8.1117 \pm 5.49
3.0	8.2340 \pm 5.52	8.1683 \pm 5.05
4.0	9.8150 \pm 5.91	7.6533 \pm 4.01
6.0	9.8300 \pm 6.31	6.3520 \pm 3.19
8.0	8.9050 \pm 7.41	4.7183 \pm 1.20
10.0	7.7433 \pm 3.99	3.5517 \pm 1.03
12.0	7.4480 \pm 2.29	2.4667 \pm 1.38
24.0	1.1400 \pm 0.57 (n=4)	1.1733 \pm 0.36 (n=3)
27.0	0.9300 \pm 0.0 (n=1)	1.0300 \pm 0.0 (n=1)
30.0	ND	ND

ND = No detectable

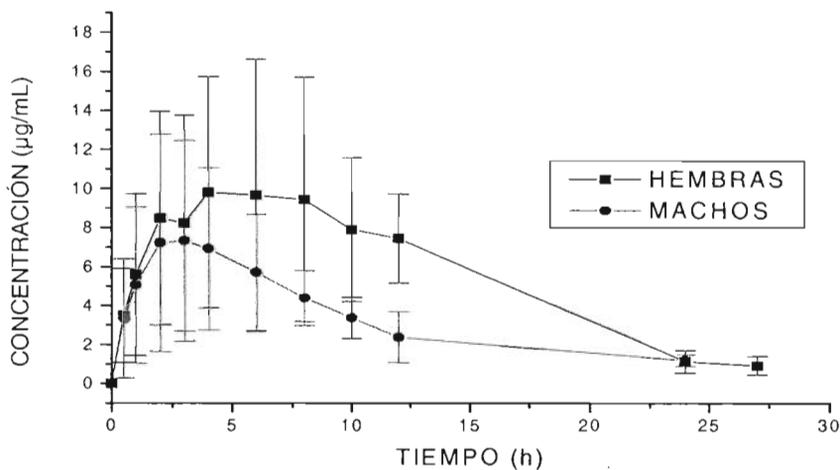


FIGURA 12. Graficas de concentración plasmática promedio \pm D.E. vs tiempo e escala normal.

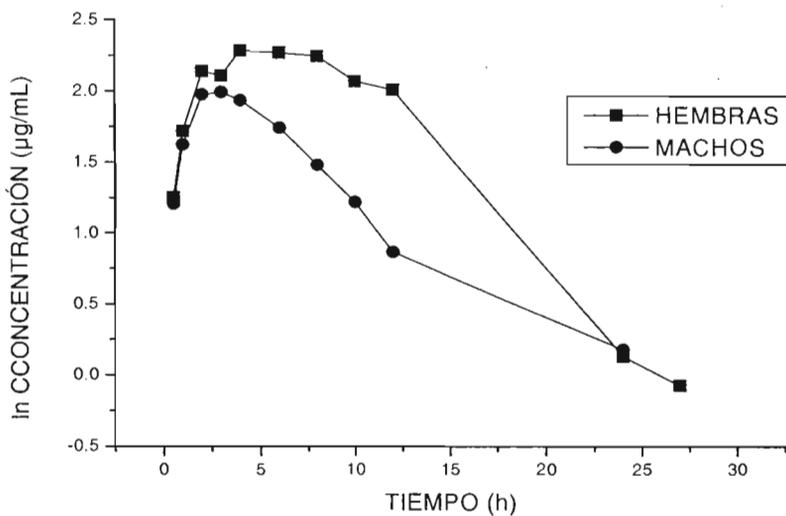


FIGURA 13. Grafica de ln concentración plasmática promedio vs tiempo en escala semilogaritmica.

En la figura 12 se observan las gráficas de concentración plasmática promedio \pm D.E. vs tiempo donde se observa que la concentración plasmática máxima en ratas hembra y macho es de 9.83 y 8.17 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente con un tiempo máximo de 6.0 y 3.0 horas.

5.5. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Los resultados promedio de los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 20 tanto para ratas machos como para hembras. Los resultados individuales se encuentran en el apéndice II.

Tabla 20. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PROMEDIO		
PARÁMETRO FARMACOCINÉTICO	RATAS HEMBRA	RATAS MACHO
	PROMEDIO \pm D.E	PROMEDIO \pm D.E.
ABC_{0-t}	142.0360 \pm 73.12	72.8476 \pm 13.86
ABC_{0-inf}	151.1541 \pm 67.81	96.7111 \pm 28.57
C_{max}	10.9950 \pm 6.46	9.2950 \pm 4.73
t_{max}	4.8943 \pm 2.27	4.1052 \pm 3.17
$t^{1/2}$	6.3588 \pm 3.67	6.5708 \pm 3.70

Como se observa en la tabla 20 los parámetros farmacocinéticos $t^{1/2}$ y t_{max} tanto para ratas hembra como machos, son muy semejantes. Para C_{max} se observa una ligera diferencia en ratas macho el valor es mayor que en ratas hembra. Las diferencias significativas se observan en ABC_{0-t} y ABC_{0-inf} ya que el área bajo la curva es mayor en las ratas hembra que en las macho.

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL GÉNERO EN LA FARMACOCINÉTICA DE METRONIDAZOL.

Tabla 21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE RATAS MACHO Y HEMBRAS					
parámetro farmacocinético	Prueba de Normalidad	Prueba de Igualdad de Varianza	ANOVA	Prueba de t	P=0.05
ABC_{0-t}	Cumplió (P = 0.0895)	Cumplió (P = 0.2765)	Cumplió (P = 0.198)	Cumplió (P = 0.046)	NS
ABC_{0-inf}	Cumplió (P = 0.0709)	Cumplió (P = 0.2992)	Cumplió (P = 0.109)	Cumplió (P = 0.106)	NS
C_{max}	Cumplió (P = 0.4888)	Cumplió (P = 0.5135)	Cumplió (P = 0.699)	Cumplió (P = 0.614)	NS
t_{max}	Cumplió (P = 0.0601)	Cumplió (P = 0.0010)	Cumplió (P = 0.699)	Cumplió (P = 0.631)	NS
$t^{1/2}$	Cumplió (P > 0.200)	Cumplió (P = 0.780)	Cumplió (P = 0.923)	Cumplió (P = 0.923)	NS

De las pruebas estadísticas realizadas a los parámetros farmacocinéticos se encontro que los datos estan distribuidos normalmente y que poseen varianzas similares, además no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos casos (Tabla 21).

En la misma tabla se puede observar que el poder de la prueba para cada parámetro es muy bajo, lo que nos indica que los resultados se deben tomar con cautela ya que no son contundentes, Se sugiere aumentar el tamaño de la muestra para llegar a tener resultados concluyentes.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- El método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución desarrollado para la cuantificación de metronidazol en plasma, fue lineal en el intervalo de concentración de 0.5 a 50 $\mu\text{g/mL}$, exacto, preciso y selectivo para metronidazol bajo las condiciones experimentales evaluadas, por lo que se considero aplicable para la cuantificación de metronidazol en plasma.
- Al evaluar los parámetros farmacocinéticos se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en la farmacocinética de metronidazol entre ratas hembra y ratas macho, sin embargo se sugiere incrementar el número de sujetos de estudio (ratas) para obtener una mayor confiabilidad en los resultados de las pruebas.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Goodman y Gilman "Las bases farmacológicas de la terapéutica" Editorial: Medica Panamericana, Buenos Aires 6ª Edición, Capitulo 42 (2000) Pág. 1057 – 1059.
2. J. Martinez "Biofarmacia y farmacocinética" Vol. 1 Editorial: Síntesis, Madrid (2001), Págs. 150-175.
3. J. G. Wagner "Farmacocinética clínica" Edit Reverte España (1983) Págs. 5 - 10.
4. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Séptima Edición Tomo 1 México 2000 pag. 869
5. E. G. C. Clarke "Isolation and identification of drugs in pharmaceutical, body fluids and post-mortem material" Editorial: The pharmaceutical, London (1986), Pág. 780 – 781.
6. A. R. Gennaro "Remington Farmacia" Tomo 2. 19º Edición Editorial Medica Panamericana, Argentina (1995) Págs.: 2024 – 2025.
7. B. R. Koch " A metronidazole metabolite in human urine and its risk" Science 211(23) 1981 pags. 389-400.
8. MARTINDALE "The extra pharmacopeia" Editorial Royal Pharmaceutical Society of Great Britain 31º Edición (1996) Págs. 621 – 625 London.
9. NOM-177-SSA1-1998 Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
10. R. A. Marquez, Brian Stafford. Determination of metronidazole and misonidazole and their metabolites in plasma and urine by high performance liquid Chromatography Journal of Chromatography, 146 (1978) 163-166

11. K. Lanbeck and Bjorn Lindstrom. Determination of metronidazole and tinidazole in plasma and feces by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 162 (1979) 117-121.
12. J. Chris Jensen and Roland Gugler. Sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of metronidazole and metabolites. *Journal of Chromatography*, 277 (1983) 381 – 384.
13. M. J. Galmier, A. M. Frasey, M. Bastide. Simple and sensitive method for determination of metronidazole in human serum by high – performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 720 (1998) 239-243
14. A. Menelaou, Andrew A. Somogyi, Murray L. Barclay, Felix Bochner. Simultaneous quantification of amoxicillin and metronidazole in plasma using high performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of chromatography B*. 731 (1999) 261-266.
15. Yu-Hsing Tu, Youmin Wang, Loyd V. Allen Jr, Donald D. Albers y Mousissian K. Gorgin. Pharmacokinetics of metronidazole administered intravenously to male rat. *International Journal of Pharmaceutics*, 61 (1990) 119 – 125.
16. J.M. Aiache “ Biofarmacia “Editorial: Technique et documentation, 2^a Edición, Capitulo 2 (1982) Paris Pág. 78 – 79.
17. J. A. Bevan “Fundamentos de Farmacología” Editorial: Harper & row, 2^a Edición, Capitulo 7 (1982) Mexico Págs. 70 – 71.
18. M. Gibaldi “Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics” 3^a Edición, Capitulo 12 (1984) Mexico Págs. 218 – 219.
19. N. F. Wood GLC Análisis of metronidazole in human plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 64(6); (1985) 1048-1049

APÉNDICE I

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE I

DATOS DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE METRONIDAZOL vs
TIEMPO PARA CADA RATA

RATA HEMBRA 01	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
0.0	0.0
0.5	0.61
1.0	0.84
2.0	1.18
3.0	1.41
4.0	1.35
6.0	1.14
8.0	1.02
10.0	0.95
12.0	N.D.
24.0	N.D.
27.0	N.D.
30.0	N.D.

RATA HEMBRA 02	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
0.0	0
0.5	3.98
1.0	5.45
2.0	9.11
3.0	9.35
4.0	9.97
6.0	9.33
10.0	9.26
12.0	7.42
24.0	0.86
27.0	N.D.
30.0	N.D.

RATA HEMBRA 03	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.0	0
0.5	1.28
1.0	2.54
2.0	4.92
3.0	6.75
4.0	7.84
6.0	10.87
10.0	10.83
12.0	10.71
24.0	0.71
27.0	N.D.
30.0	N.D.

RATA HEMBRA 04	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.0	0.0
0.5	6.73
1.0	11.84
2.0	14.73
3.0	N.D.
4.0	12.61
6.0	8.65
8.0	7.84
10.0	6.67
12.0	6.21
24.0	1.02
27.0	N.D.
30.0	N.D.

RATA HEMBRA 05	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.0
0.5	2.73
1.0	3.79
2.0	6.24
3.0	7.04
4.0	7.94
6.0	8.29
8.0	7.84
10.0	6.63
12.0	4.61
24.0	1.97
27.0	0.93
30.0	N.D.

RATA HEMBRA 06	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.0
0.5	5.64
1.0	9.03
2.0	14.73
3.0	16.62
4.0	19.18
6.0	20.7
8.0	18.92
10.0	12.12
12.0	8.29
24.0	N.D.
27.0	N.D.
30.0	N.D.

RATA MACHO 01	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.0
0.5	5.05
1.0	6.77
2.0	12.71
3.0	13.85
4.0	11.09
6.0	7.57
8.0	4.95
10.0	3.04
12.0	1.82
24.0	N.D.
27.0	N.D.
30.0	N.D.

RATA MACHO 02	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.0
0.5	1.16
1.0	1.99
2.0	2.86
3.0	3.80
4.0	5.39
6.0	N.D.
8.0	4.33
10.0	3.47
12.0	1.84
24.0	0.99
27.0	N.D.
30.0	N.D.

RATA MACHO 03	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.0	0.0
0.5	4.09
1.0	7.08
2.0	8.32
3.0	7.81
4.0	7.53
6.0	6.05
8.0	5.91
10.0	4.87
12.0	4.94
24.0	0.94
27.0	N.D.
30.0	N.D.

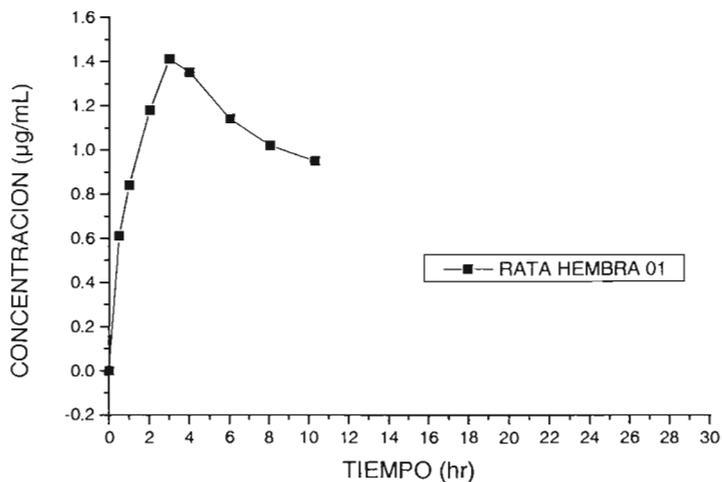
RATA MACHO 04	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.0	0.0
0.5	3.00
1.0	5.69
2.0	8.72
3.0	10.08
4.0	9.99
6.0	8.31
8.0	5.94
10.0	4.69
12.0	2.50
24.0	N.D.
27.0	N.D.
30.0	N.D.

RATA MACHO 05	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.0	0.0
0.5	0.47
1.0	0.80
2.0	0.91
3.0	0.89
4.0	0.85
6.0	0.96
8.0	2.71
10.0	2.98
12.0	2.80
24.0	1.59
27.0	1.03
30.0	N.D.

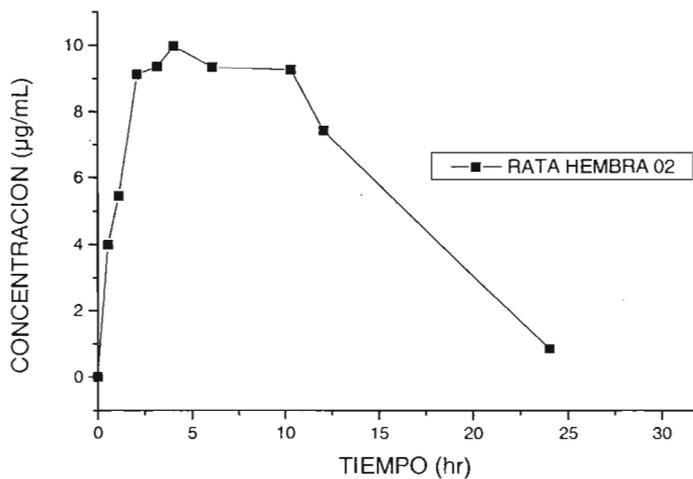
RATA MACHO 06	
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.0	0.0
0.5	9.02
1.0	11.84
2.0	15.15
3.0	12.58
4.0	11.07
6.0	8.87
8.0	4.47
10.0	2.26
12.0	0.90
24.0	N.D.
27.0	N.D.
30.0	N.D.

GRÁFICOS DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE METRONIDAZOL vs TIEMPO PARA CADA RATA

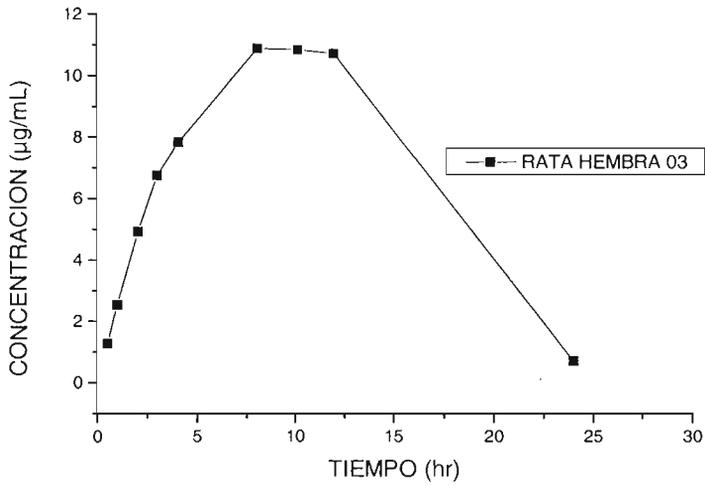
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



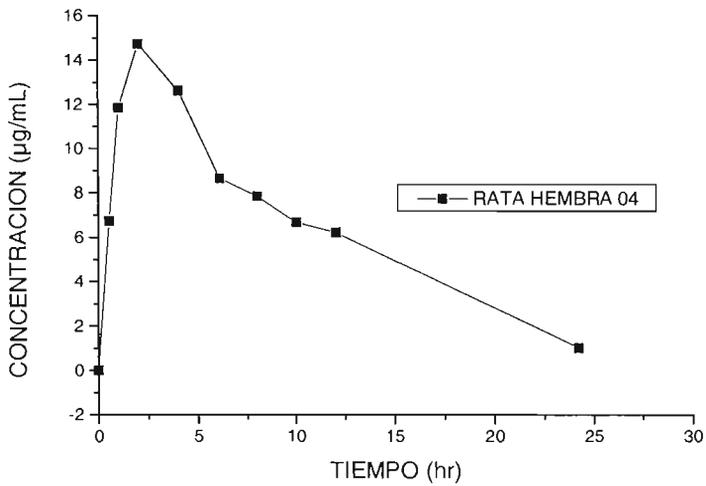
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



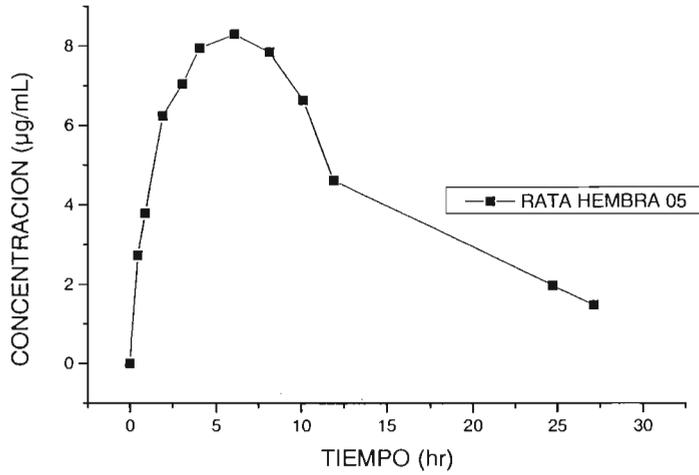
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



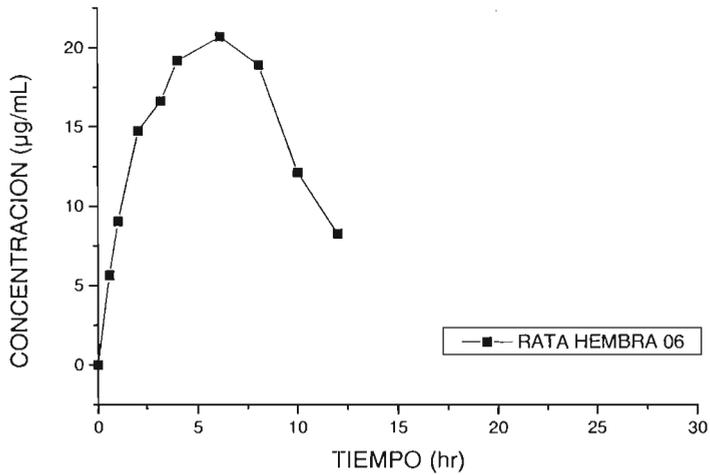
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



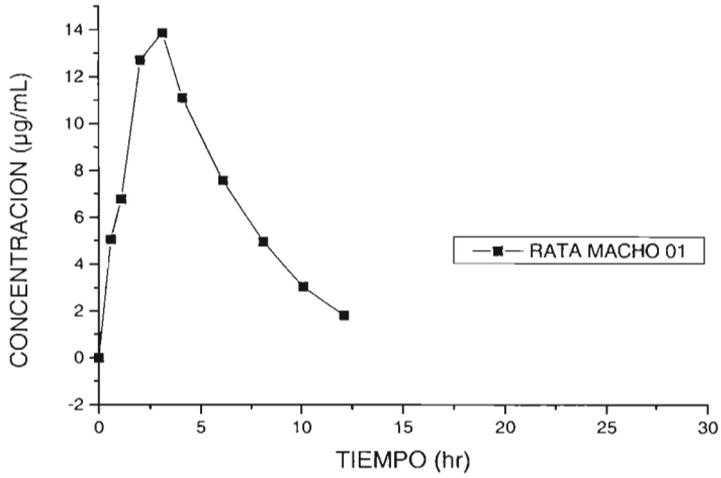
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



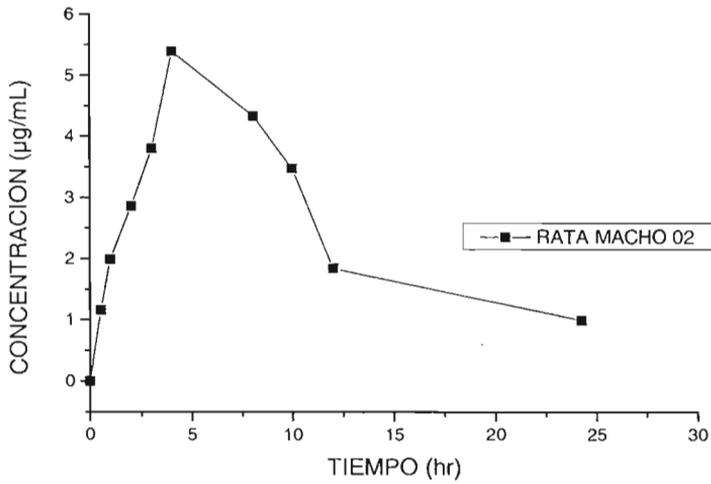
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



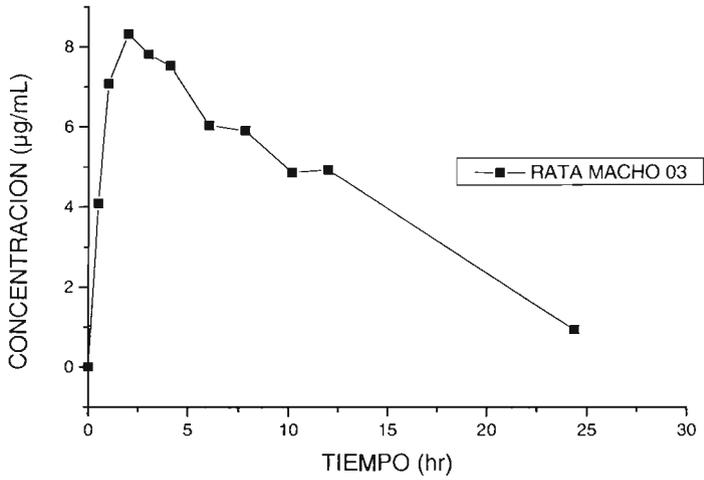
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



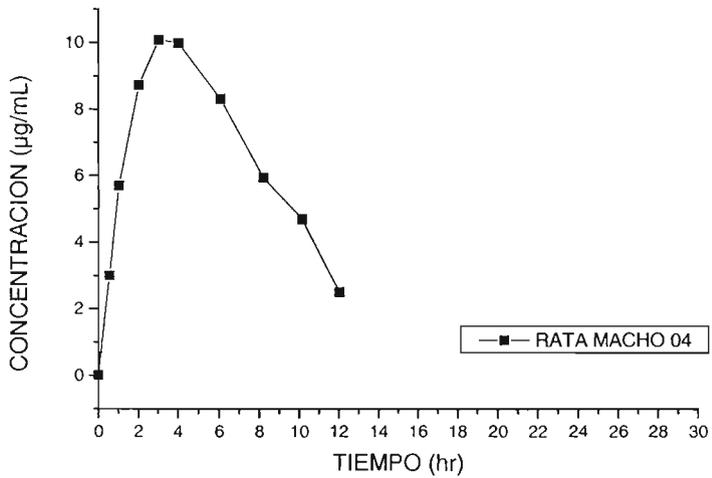
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



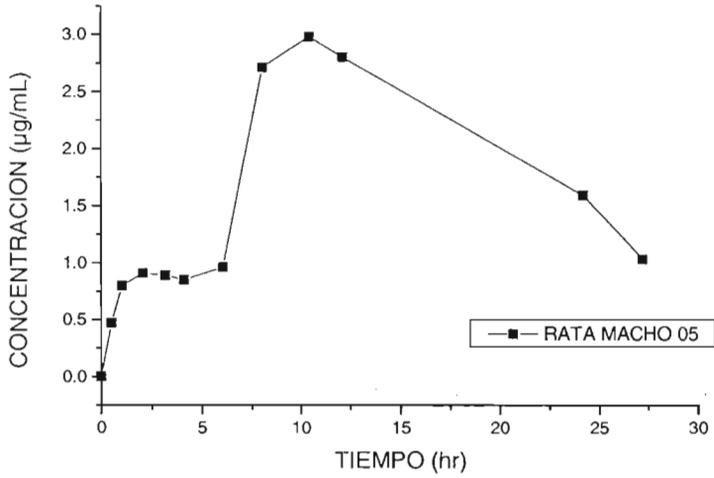
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



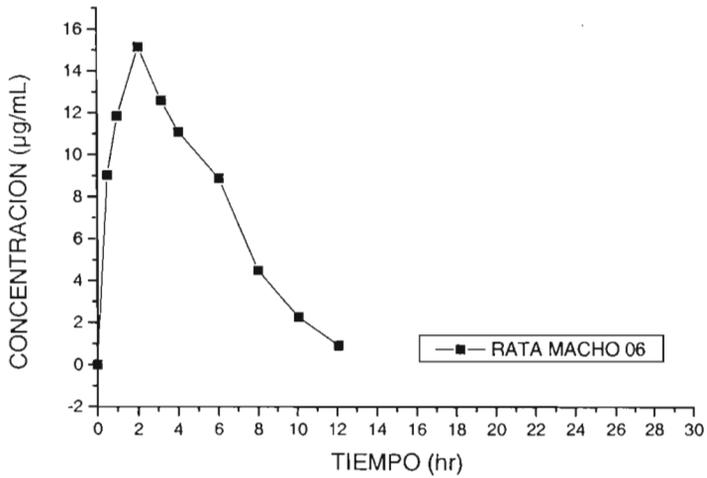
GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



GRAFICA DE TIEMPO Vs CONCENTRACION



APÉNDICE II

APÉNDICE II

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE METRONIDAZOL PARA CADA RATA

RATAS HEMBRAS					
NUMERO DE RATA	$t^{1/2}$	t_{max}	C_{max}	ABC_{0-t}	ABC_{0--inf}
1	12.5167	3.0000	1.4100	11.1183	28.2732
2	4.0869	4.0500	9.9700	154.4753	159.9540
3	3.3450	8.0830	10.8700	166.8912	170.3175
4	6.7076	2.0000	14.7300	156.2842	164.6833
5	8.4381	6.1000	8.2900	129.4434	143.4430
6	3.0586	6.1330	20.7000	234.0034	236.2538

RATAS MACHO					
NUMERO DE RATA	$t^{1/2}$	t_{max}	C_{max}	ABC_{0-t}	ABC_{0--inf}
1	3.1087	3.1160	13.8500	84.3792	92.5417
2	7.9994	4.0160	5.3900	61.3156	72.7410
3	10.2914	2.0160	8.3200	73.4579	146.8040
4	4.9380	3.0500	10.0800	73.8722	107.2840
5	10.9048	10.4000	2.9800	53.4411	67.4429
6	2.1824	2.0330	15.1500	90.6194	93.4531

APÉNDICE III

APÉNDICE III

ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARATIVO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE METRONIDAZOL ENTRE RATAS HEMBRA Y RATAS MACHO EMPLEANDO EL PROGRAMA ESTADÍSTICO Sigma Stad[®].

A. Análisis estadístico empleando la prueba de t - student

Análisis estadísticos para $t^{1/2}$.

t-test

Tuesday, August 31, 2004, 08:42:37

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.780)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
T1/2	RH	6	0	6.359	3.674	1.500
T1/2	RM	6	0	6.571	3.703	1.512

Difference -0.212

t = -0.0995 with 10 degrees of freedom. (P = 0.923)

95 percent confidence interval for difference of means: -4.957 to 4.533

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.923).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.

You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadísticos para Ke

t-test

Tuesday, August 31, 2004, 08:54:15

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P = 0.135)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.612)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Ke	RH	6	0	6.286	2.408	0.983
Ke	RM	6	0	4.888	3.564	1.455

Difference 1.398

t = 0.796 with 10 degrees of freedom. (P = 0.444)

95 percent confidence interval for difference of means: -2.514 to 5.310

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.444).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadísticos para Cmax

t-test

Tuesday, August 31, 2004, 08:48:04

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.732)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
-------	------	---	---------	------	---------	-----

Cmax	RH	6	1	10.995	6.456	2.636
Cmax	RM	6	1	9.295	4.727	1.930

Difference 1.700

t = 0.520 with 10 degrees of freedom. (P = 0.614)

95 percent confidence interval for difference of means: -5.578 to 8.978

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.614).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800

You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadístico para Tmax

t-test

Tuesday, August 31, 2004, 08:50:57

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P = 0.182)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.910)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Tmax	RH	6	1	4.894	2.273	0.928
Tmax	RM	6	1	4.105	3.174	1.296

Difference 0.789

t = 0.495 with 10 degrees of freedom. (P = 0.631)

95 percent confidence interval for difference of means: -2.762 to 4.341

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.631).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800.
You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadístico para ABC_{0-t}

t-test

Tuesday, August 31, 2004, 08:58:32

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P = 0.014)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.185)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ABCo-t	RH	6	1	142.036	73.118	29.850
ABCo-t	RM	6	1	72.848	13.855	5.656

Difference 69.188

t = 2.277 with 10 degrees of freedom. (P = 0.046)

95 percent confidence interval for difference of means: 1.494 to 136.883

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.046).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.448

The power of the performed test (0.448) is below the desired power of 0.800.
You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadístico para ABC_{0-inf}

t-test

Tuesday, August 31, 2004, 09:01:06

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P = 0.182)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.381)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ABC ₀ -inf	RH	6	1	150.154	67.811	27.684
ABC ₀ -inf	RM	6	1	96.711	28.567	11.662

Difference 53.443

t = 1.779 with 10 degrees of freedom. (P = 0.106)

95 percent confidence interval for difference of means: -13.490 to 120.376

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.106).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.254

The power of the performed test (0.254) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadísticos para Ka

t-test

Tuesday, August 31, 2004, 08:56:47

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.637)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Ka	RH	6	1	2.378	1.720	0.702
Ka	RM	6	1	2.824	2.724	1.112

Difference -0.446

t = -0.339 with 10 degrees of freedom. (P = 0.741)

95 percent confidence interval for difference of means: -3.377 to 2.484

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ($P = 0.741$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

B. Análisis estadístico empleando la prueba de ANOVA

Análisis estadísticos para $t^{1/2}$.

One Way Analysis of Variance

Tuesday, August 31, 2004, 08:45:25

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed ($P > 0.200$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.780$)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
T _{1/2}	RH	6	0	6.359	3.674	1.500
T _{1/2}	RM	6	0	6.571	3.703	1.512

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.135	0.135	0.00991	0.923
Residual	10	136.078	13.608		
Total	11	136.213			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.923$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously

Análisis estadísticos para Ke

One Way Analysis of Variance

Tuesday, August 31, 2004, 08:54:59

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P = 0.135)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.612)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Ke	RH	1	6.286	2.408	0.983	
Ke	RM	1	4.888	3.564	1.455	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	5.862	5.862	0.634	0.444
Residual	10	92.482	9.248		
Total	11	98.344			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.444).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadísticos para Cmax

One Way Analysis of Variance

Tuesday, August 31, 2004, 08:49:03

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.732)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Cmax	RH	1	9.295	4.727	1.930	
Cmax	RM	1	10.995	6.456	2.636	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	8.670	8.670	0.271	0.614

Residual	10	320.117	32.012
Total	11	328.787	

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.614$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadístico para Tmax

One Way Analysis of Variance

Tuesday, August 31, 2004, 08:52:27

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed ($P = 0.182$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.910$)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Tmax	RH	1	4.894	2.273	0.928	
Tmax	RM	1	4.105	3.174	1.296	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	1.868	1.868	0.245	0.631
Residual	10	76.217	7.622		
Total	11	78.086			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.631$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadístico para ABC₀₋₁

One Way Analysis of Variance

Tuesday, August 31, 2004, 08:59:35

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P = 0.014)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.185)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ABC ₀₋₋₁	RH	1	142.036	73.118	29.850	
ABC ₀₋₋₁	RM	1	72.848	13.855	5.656	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	14361.104	14361.104	5.186	0.046
Residual	10	27691.385	2769.138		
Total	11	42052.489			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.046).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.448

The power of the performed test (0.448) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 5 vs. Col 11	69.188 2	3.221	0.046	Yes	

Análisis estadístico para ABC_{0--inf}

One Way Analysis of Variance

Tuesday, August 31, 2004, 09:01:55

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P = 0.182)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.381)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ABC _{0-inf} RH	1	1	150.154	67.811	27.684
ABC _{0-inf} RM	1	1	96.711	28.567	11.662

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	8568.468	8568.468	3.165	0.106
Residual	10	27071.926	2707.193		
Total	11	35640.394			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.106$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.254

The power of the performed test (0.254) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

Análisis estadísticos para Ka

One Way Analysis of Variance

Tuesday, August 31, 2004, 08:57:50

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed ($P > 0.200$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.637$)

Group	Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Ka	RH	1	2.378	1.720	0.702	
Ka	RM	1	2.824	2.724	1.112	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.598	0.598	0.115	0.741
Residual	10	51.892	5.189		
Total	11	52.490			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.741$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.