

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**“DETERMINACION DE GRISEOFULVINA EN FLUIDOS  
BIOLOGICOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
**P R E S E N T A**  
**B E A T R I Z S I L V A V E G A**

**MEXICO, D. F.**

**1 9 8 3**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

INDICE GENERAL.

	pag.
<u>I.- INTRODUCCION.</u>	1
<u>II.- GENERALIDADES.</u>	3
<u>II.1. Propiedades Fisicoquímicas.</u>	4
II.1.1. Nombres químicos y sinónimos.	4
II.1.2. Fórmula condensada.	4
II.1.3. Fórmula desarrollada.	4
II.1.4. Composición porcentual.	4
II.1.5. Peso molecular.	4
II.1.6. Solubilidad.	5
II.1.7. pKa.	5
II.1.8. Rotación óptica específica.	5
II.1.9. Descripción.	5
II.1.10. Punto de fusión.	5
II.1.11. Espectro de U.V.	5
<u>II.2. Uso Clínico.</u>	6
II.1.1. Dermatomicosis.	6
II.1.2. Modo de acción de la Griseofulvina.	7
II.1.3. Efectividad Clínica.	8
II.1.4. Tratamiento.	9
<u>II.3. Métodos de Valoración en Fluidos Biológicos.</u>	10
II.3.1. Método espectrofluorométrico.	11
II.3.2. Método biológico.	13
II.3.3. Método de cromatografía.	14
II.3.4. Método de cromatografía de gas-líquido.	15
II.3.5. Determinación de la 6-desmetilgriseofulvina.	19

	Pag.
<u>III. PARTE EXPERIMENTAL.</u>	21
<u>III.1. Determinación de Griseofulvina en orina por C.G.L. utilizando detector de ionización de llama.</u>	22
III.1.1. Material y equipo.	22
III.1.2. Reactivos.	22
III.1.3. Soluciones.	22
III.1.4. Preparación de las diluciones.	22
III.1.5. Método de extracción.	23
III.1.6. Estabilidad.	24
III.1.7. Coeficiente de Variación en la extracción.	24
<u>III.2. Determinación de Griseofulvina en plasma por C.G.L. utilizando detector de captura de electrones.</u>	25
III.2.1. Material y equipo.	25
III.2.2. Reactivos.	25
III.2.3. Soluciones.	25
III.2.4. Preparación de las diluciones.	25
III.2.5. Método de extracción.	26
III.2.6. Variación en la extracción.	27
III.2.7. Estabilidad.	27
<u>IV.-RESULTADOS.</u>	28
<u>IV.1. Determinación de Griseofulvina en orina utilizando detector de ionización de llama.</u>	28
IV.1.1. Linealidad.	29
IV.1.2. Determinación de la concentración real - y % de extracción de Griseofulvina en orina.	42

	página
IV.1.3. Coeficiente de Variación en la extracción.	51
IV.1.4. Estabilidad.	51
<u>IV.2. Determinación de Griseofulvina en plasma utilizando detector de captura de electrones.</u>	53
IV.2.1. Linealidad.	53
IV.2.2. Coeficiente de Variación en la extracción.	59
IV.2.3. Estabilidad.	60
<u>V.- DISCUSION DE RESULTADOS.</u>	61
<u>V.1. Determinación de Griseofulvina en orina utilizando detector de ionización de llama.</u>	61
a). Sensibilidad.	62
b). Cantidad mínima detectable.	63
c). Linealidad.	63
d). Coeficiente de correlación.	64
e). Coeficiente de variación.	64
f). Estabilidad.	64
g). Especificidad.	65
<u>V.2. Determinación de Griseofulvina en plasma utilizando detector de captura de electrones.</u>	65
a). Cantidad mínima detectable.	65
b). Linealidad.	66
c). Coeficiente de correlación.	66
<u>VI.- CONCLUSIONES.</u>	70
<u>VII.- BIBLIOGRAFIA.</u>	74

LISTA DE TABLAS.

No.	pag.
1 - Determinación No. 1 de Griseofulvina en orina utilizando detector de ionización de llama.	31
2 - Determinación No. 2 de Griseofulvina en orina utilizando detector de I. Llama.	32
3 - Determinación No. 3 de Griseofulvina.	33
4 - Determinación No. 4 de Griseofulvina en orina utilizando detector de I. Llama.	34
5 - Determinación del Coeficiente de Correlación, Pendientes e Interceptos de las curvas estandar y problema de Griseofulvina utilizando detector de I. Llama.	39
6-9 Determinación de la Coconcentración Real y del % de extracción por la interpolación de los datos presentados en las tablas No 1-4 respectivamente.	43-46
10- Coeficiente de Variación en la extracción, para una concentración de 2 mcg/ml.	51
11- Estabilidad de Griseofulvina en orina en un periodo de cuatro semanas.	52
12- Determinación de Griseofulvina en Plasma utilizando detector de captura de electrones ( en las determinaciones 5-8)	55
13- Determinación de Griseofulvina en Plasma utilizando detector de captura de electrones ( en las determinaciones 9-12)	56

## LISTA DE FIGURAS.

No		pag.
1	Cromatograma de Griseofulvina en orina utilizando detector de ionización de llama.	30
2	Determinación de Griseofulvina en orina utilizando detector de I. Llama. (datos de la tabla No. 1).	35
3	Determinación de Griseofulvina en orina utilizando detector de I. Llama. ( datos de la tabla No. 2)	36
4	Determinación de Griseofulvina en orina utilizando detector de I. Llama. (datos de la tabla No. 3)	37
5	Determinación de Griseofulvina en orina.( datos de la latabla No. 4).	38
6	Linealidad de las curvas de Referencia en la <u>deter</u> minación de Griseofulvina en orina utilizando de-- tector de I, Llama.	40
7	Linealidad de las cuatro curvas Problema en la <u>deter</u> minación de Griseofulvina en orina, utilizando <u>detec</u> tor de I. de Llama.	41
8-11	Determinación de la Concentración Real de Griseo- fulvina en orina por la interpolación en la curva de referencia, en cada experimento.	47-50
12	Cromatograma de Griseofulvina en plasma utilizando detector de Captura de electrones.	54
13	Curvas de Griseofulvina en Plasma; utilizando de- tector de captura de electrones. Datos correspon- dientes a las tablas No. 12 y 13.	57

No.		pag.
14-	Resultados de interceptos, pendientes y coeficiente de correlación en la determinación de <u>Gri</u> seofulvina en plasma, utilizando detector de C.E.	58
15-	Coefficiente de Variación en la Extracción en la - determinación de Griseofulvina en plasma; para una concentración de 125 ng/ml.	59
16-	Estabilidad de Griseofulvina en plasma en un período de cuatro semanas.	60
17-	Datos de covarianza para el análisis de pendientes de los experimentos 1-4 en la determinación de Griseofulvina en orina.	63
18-	Datos del análisis estadístico para la prueba de <u>es</u> tabilidad de la Griseofulvina en orina.	65
19-	Análisis estadístico para Coeficiente de correlación en la determinación de Griseofulvina en plasma.	67
20-	Análisis de covarianza para observar diferencias - entre pendientes de las curvas en la determinación de Griseofulvina en plasma.	69



I.-INTRODUCCION.

La Griseofulvina es un antimicótico producido por cepas de hongos de Penicillium griseofulvum diercky, Penicillium jancewski, Penicillium patulum y Penicillium nigricans; su actividad antifúngica se manifiesta cuando se administra por vía oral y para el tratamiento de las dermatomicosis, causadas por hongos del grupo de los Dermatofitos.

En general la Griseofulvina es un agente eficaz; pero existen casos en los que la lesión no es curada por este fármaco o también existen recaídas posteriormente. Esto se puede explicar en base a que los microorganismos desarrollan resistencia; o por una absorción deficiente en el tracto gastrointestinal; ya que tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la Griseofulvina, ésta presenta problemas de solubilidad que se ven reflejados en la absorción del fármaco.

En México no existe un método analítico para la determinación de Griseofulvina que satisfaga las exigencias que requiere la determinación en fluidos biológicos. Debido a esto surgió el interés por desarrollar un método analítico que pueda ser aplicado en la cuantificación de Griseofulvina en fluidos biológicos con el fin de realizar estudios posteriores de farmacocinética y biodisponibilidad.

Los parámetros que se tomaron en cuenta para desarrollar este método fueron: sensibilidad, linealidad, reproducibilidad y cantidad mínima detectable.

Estos parámetros de acuerdo a modelos estadísticos describen la confiabilidad del método.

II.- GENERALIDADES.

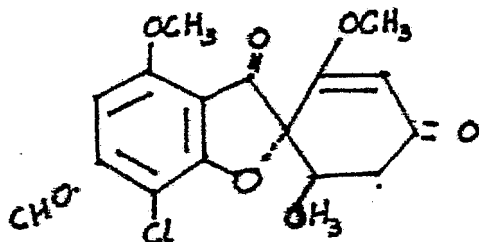
## II.1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

II.1.1 -Nombres químicos y sinónimos: El nombre químico de la - Griseofulvina es: (2S-trans)-7 cloro-2',4,6,-trimetoxi-6'metil-spiro- bensofurano-2 (3H),1'ciclohexen -3,4'diona.

Otros nombres con los que se le conoce son: Curlin Gactor, Fulcín, Fulvicín, Fulvín, Grisactin, Grisovín. Gris/PEG, Grisio, Likudén, Neofulcin, Pencyl, Speiro Fulvín, Sporostatin. (1).

II.1.2. Fórmula Condensada:  $C_{17}H_{17}ClO_6$

II.1.3. Fórmula Desarrollada:



La Griseofulvina obtenida por síntesis química es una mezcla racémica dl-Griseofulvina, mientras que la obtenida por bio síntesis es +Griseofulvina (6-9).

II.1.4. Composición Porcentual:

C= 57.88%, H= 4.86%, Cl= 10.05%, O= 27.21%

II.1.5. Peso molecular: 352.77

II.1.6. Solubilidad: Sumamente soluble en tetracloroetano, diclorometano, ligeramente soluble en etanol y metanol, soluble en acetona dimetil formamida (12-14 g/100 ml a 25°C) y en cloroformo, ligeramente soluble en agua (15 mcg/ml a 37°C, 10 mcg/ml a 25°C) (1,2,3,). La solubilidad en agua se puede aumentar para las pruebas de disolución de las formas farmacéuticas, así como para la solubilidad del mismo principio activo, mediante el uso de tensoactivos, evitando así la aglomeración de partículas. (5).

II.1.7. pka: La Griseofulvina en un compuesto neutro.

II.1.8. Rotación Óptica Específica:  $\alpha \left[ \frac{17}{D} \right] = + 370^\circ$

II.1.9. Descripción: La Griseofulvina es un polvo blanco o crema pálido cuyo tamaño de partícula especificado en la Farmacopea U.S.P.XIX, es del orden de 4 mc; en la Farmacopea Británica establece el diámetro de la partícula como 5 mc como máximo, sin embargo en el polvo pueden encontrarse partículas que excedan de las 30 mc.

II.1.10. Punto de fusión: 218-224°C.

II.1.11. Espectro de U.V.: La absorción de la Griseofulvina al U.V. presenta dos máximos a 286 y 325 nm, con un coeficiente de extinción de 2300 y 5200 respectivamente.

## II.2. USO CLINICO.

La Griseofulvina es un agente antifúngico ampliamente utilizado en el tratamiento de las dermatomicosis. Es el único fármaco efectivo por vía oral para el tratamiento de estas enfermedades.

La Griseofulvina fue aislada en 1939 por Oxford y col. de una cepa de Penicillium griseofulvum dierckii (21). En 1946 encontraron una sustancia producida por Penicillium janzewskyi que producía retracción de las hifas micóticas, la cual llamaron factor rizador, más tarde se descubrió que era Griseofulvina. Otros hongos que producen esta sustancia es el P. patulum, P. nigrificans.

Durante los diez años que siguieron a su descubrimiento, el antibiótico se empleó mucho en el tratamiento de diversas enfermedades micóticas de plantas y de tiña del ganado vacuno. Durante una investigación de diversos compuestos terapéuticos para el tratamiento de las infecciones micóticas de pies de los mineros escoceses, Gentes en 1958 observó que la Griseofulvina curaba la micosis experimental del cobayo. El medicamento se sometió a investigaciones clínicas en E.U. y en Europa y pronto estuvo disponible para aplicarse en clínica.

II.2.1.Dermatomicosis: Las dermatomicosis son enfermedades infecciosas de la piel y estructuras relacionadas como son uñas y cuero cabelludo causadas por hongos del grupo de los Dermatofitos. Este grupo de hongos representa tres géneros: Epidermophyton, Microsporum y Trichophyton. Ocasionalmente las dermatomicosis son causadas por Candida albicans. (22)

Las infecciones causadas por las diferentes tineas son clasificadas de acuerdo al sitio de la infección.

- Tinea Capitis: infección crónica que involucra cuero cabelludo; es altamente infecciosa.
- Tinea Barbae: afecta el área barbada de la cara y cuello.
- Tinea Unguium: también llamada onicomycosis, es una infección crónica que afecta las uñas de los pies y manos.
- Tinea Corporis: infección que afecta la piel.
- Tinea Imbricata: es un caso de tinea corporis causada por *T. concentricum* y está confinada al Lejano Oriente, Africa y Sudamérica.
- Tinea Cruris: infección superficial crónica que afecta el área interglútea de la región inguinal y perianal y ocasionalmente la axila.
- Dermatomycosis de manos y pies.

II.2.2. Modo de acción de la Griseofulvina: Nakeeb y col. (23) - determinaron las concentraciones de los dermatofitos (altamente sensibles); hongos filamentosos no patógenos (poco sensibles); levaduras y *E. coli* (insensibles a la Griseofulvina). Los hongos patógenos *Microsporum gypseum* y especies de *Trichophyton* fueron los que presentaron mayor sensibilidad a la Griseofulvina que ningún otro microorganismo estudiado.

La Griseofulvina actúa en los sistemas enzimáticos de los hongos sensibles provocando inhibición de la producción de amilasa, incremento de las alquilfosfatasa y decremento de las esterasas.

Los estudios realizados por Huber y col(16) encontraron que los micelios de los hongos tratados con Griseofulvina eran afectados en su composición. Se encontró que tanto el contenido de DNA, como el fosfato y el RNA disminuían poco, las proteínas totales permanecieron inalteradas, pero los carbohidratos y los lípidos totales decrecieron.

La Griseofulvina presenta acción antiinflamatoria en artritis, gota y condiciones similares (24). Este efecto es importante en el tratamiento de las dermatomicosis.

II.2.3. Efectividad Clínica. Aunque en general la Griseofulvina es un agente terapéutico eficaz, existen casos en los que la lesión no es curada por este fármaco; o bien es curada clínicamente y presenta recaídas.

En algunos casos estas fallas se pueden explicar en base al desarrollo de resistencia por los microorganismos, o por una -- absorción deficiente de la Griseofulvina en el tubo gastrointestinal. Sin embargo, existen casos en los que las razones no pueden determinarse.

Las infecciones en los pliegues interdigitales de los pies debidas a T. rubrum son particularmente resistentes a la terapia con Griseofulvina, ocurriendo fácilmente recaídas o reinfecciones. Aunque en la mayor parte de los casos el hongo es sensible al antibiótico, existe la posibilidad de que el antibiótico no se distribuya en ese sitio anatómico en la misma forma que en las otras áreas, debido posiblemente a la alta humedad local.

En casos de existir alguna infección asociada con bacterias o algunas especies de Cándida, cabría la posibilidad de que el fármaco fuera degradado, evitando así su acción (25).

En 1965 Anderson (26) efectuó una revisión de la utilidad de la Griseofulvina; recopilando los resultados de los estudios clínicos, pudo observar la efectividad de la Griseofulvina.



Infecciones del cuero cabelludo	93.1% de efectividad
Infecciones del tronco y extremidades	64.8% de efectividad
Infecciones de palmas y plantas	53.3% de efectividad
Infecciones de uñas de pies y manos	56.9% de efectividad.

II.2.4. Tratamiento. El tratamiento de las dermatomicosis puede incluir dos tipos de terapia, local y sistémica. Para la primera los agentes más empleados son el Ácido Undecilénico, el Tolnaftato y el Ácido Octoico. Para la terapia sistémica el único agente disponible es la Griseofulvina. La principal forma farmacéutica es el comprimido, aunque también se utiliza la suspensión acuosa (27).

Los comprimidos se presentan conteniendo 125, 250, 500 mg de Griseofulvina micronizada. La suspensión contiene 125 mg/ml.

### II.3. METODOS DE VALORACION EN FLUIDOS BIOLOGICOS.

Para el estudio de la farmacocinética y biodisponibilidad de la Griseofulvina a partir de diferentes formas farmacéuticas (tabletas, suspensiones, soluciones parenterales), es necesario la determinación de la Griseofulvina y/o sus metabolitos en los fluidos biológicos.

Los métodos analíticos deben ser muy sensibles, ya que los niveles que se encuentran en los fluidos biológicos son del orden de mcg/ml.

Los principales fluidos biológicos en los que se efectúan estas determinaciones son plasma y orina, se pueden analizar también piel, sudor y heces fecales.

El principal metabolito de la Griseofulvina es la 6-desmetilgriseofulvina que se excreta en la orina en forma libre o conjugada como glucorónido; otro metabolito detectado en menor proporción es 4-desmetilgriseofulvina (10).

Para escoger un método analítico se deberá tomar en cuenta:

- procedimiento,
- estabilidad de los constituyentes,
- linealidad del método,
- tiempo de reacción,
- estudios de recuperación,
- precisión,
- interferencias,
- comparación en métodos,
- índice terapéutico.

### II.3.1. Método Espectrofluorométrico.

La Griseofulvina absorbe radiaciones de longitud de onda en el rango de 295-315 nm adquiriendo un estado excitado y regresa a su estado basal al emitir radiaciones que son analizadas en el rango de longitud de onda de 420-450 nm.

Al efectuar las determinaciones se debe tener control sobre la temperatura, porque la fluorescencia decrece marcadamente al aumentar la temperatura. El método es prácticamente independiente del pH en un rango de 3-10.

La fluorescencia se incrementa linealmente en un rango de 0.05 a 5.0 mcg/ml.

Todos los ensayos espectrofluorométricos son básicamente modificaciones del método original de Redford y col. (11). Dicho método <sup>↓</sup>consiste en hacer una extracción con éter de una pequeña muestra de sangre o plasma de un individuo al que se le ha administrado la Griseofulvina. De esta fase etérea se toma una alícuota que se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en etanol al 1 % en agua, y se determina la fluorescencia contra un estándar de Griseofulvina.

Se utilizan como blanco muestras de sangre, tratadas en la misma forma.

La primera modificación del método de Redford, fue hecha por Kraml y col. (12), donde cambiaron el disolvente empleado en el método original (etanol al 1% en agua) por etanol anhidro o metanol con lo que lograron soluciones transparentes.

El uso de metanol presenta la ventaja de poder usarlo grado reactivo, que no contiene impurezas fluorométricas.

Rowlan y col (13) introdujeron una modificación consistente en hacer la determinación de la fluorescencia antes y después - de la adición de Acido Sulfurico 6N. Las lecturas se hicieron a una longitud de onda de 315 nm para la excitación y a 450 nm pa ra la emisión. La determinación hecha después de la adisión, co rresponde al blanco y el valor obtenido se resta de la lectura - antes de la adición del ácido.

La última modificación del método (14) fue hecha para evitar los problemas que resulta de la descomposición de las lípopte inas del plasma, que producen un incremento en la lectura del - blanco. Las lípopteinas son eliminadas por una extracción con éter, la fase eterea se evapora a sequedad y se redisuelve en - metanol-agua 1:1 y se hace una segunda extracción con hexano.

La eficiencia de las extracciones se determina adicionando \_ cantidades conocidas de Griseofulvina a plasma humano dentro de un rango de 0.1 a 1.5 mc/ml y analizando las muestras por el mé todo espectrofluorométrico. Las longitudes de onda para las lec turas fueron: 300 nm para la excitación y 420 nm para la fluore sencia máxima.

Se encontró que la recuperación variaba de 88 a 102% con un promedio de 93%, y parece ser independiente de la concentración dentro del rango mencionado.

El metabolito 6-desmetilgriseofulvina no interfiere con esta determinación, ya que su fluorescencia disminuye a pHs mayores - de 2.4 y es prácticamente nula a pH de 7 (15). Sin embargo se ob tienen valores más altos al comparar con C.G.L.; que Schwarz - explica en base a la contribución que pueda tener el metabolito en la medición de la fluorescencia.

El método espectrofluorométrico es aplicable también en la de terminación de Griseofulvina en sudor modificando el procedimiento de extracción (14).

A la muestra de sudor se le adiciona bicarbonato al 10% para neutralizar, y se efectúa la extracción con éter. La capa eterea se lava varias veces con agua y se evapora a sequedad. La Griseofulvina se determina como se ha descrito.

### II.3.2-Método Biológico.

Debido a la propiedad que posee la Griseofulvina de inhibir el desarrollo de determinados hongos, se puede realizar una cuantificación empleando sistemas biológicos. De esta manera se desarrolló un primer método que es una modificación del ensayo cilindro-placa empleado para las penicilinas, usando como organismo - de prueba Microsporium gypseum. La concentración mínima que este método puede detectar en fluidos biológicos es de 0.9 mcg/ml (16) Por lo cual; el método no resultó adecuado ya que los niveles que se pueden encontrar en sangre son inferiores a 0.9 mcg/ml.

En 1969 se reportó una técnica de microcultivo para la determinación de la actividad antifúngica (16). El método se basa en la determinación de la velocidad del crecimiento sin tener que llegar a la inhibición completa como el método anterior.

La técnica de microcultivo se podría emplear en la determinación de niveles sanguíneos, ya que la cantidad mínima detectable es 10 veces menor que la del método espectrofluorométrico. En la técnica de microcultivo se detectan desde 0.01 mcg/ml, mientras que el método espectrofluorométrico detecta 0.1 mcg/ml.

Para el desarrollo de una cepa de Microsporium gypseum, se -

usa un medio de agar Sabouraud, incubado durante cinco días. El medio basal es Sabouraud líquido. Utilizando una jeringa, se coloca una delgada línea de petrolato a lo largo de los dos bordes paralelos de cada portaobjeto (previamente esterilizado) y sobre la línea media perpendicular a los bordes. En cada portaobjeto se colocan tres cubreobjetos formando un total de seis cámaras. Los tubos capilares conteniendo la suspensión de conidias se colocan adyacentes al cubreobjetos y se libera una pequeña cantidad de inóculo (aproximadamente 0.1 ml) que por capilaridad penetra en la cámara. Después de la inoculación se sellar con petrolato los bordes faltantes, dejando sólo los surcos abiertos para el intercambio de aire.

Los microcultivos se incuban en la oscuridad a 35°C en una cámara húmeda durante 16 hrs. anteriores a la determinación. La curva estandar se elabora graficando logaritmo de dosis contra velocidad de crecimiento.

Aunque no se encontró ningún estudio de niveles plasmáticos de la Griseofulvina que utilizara este método en sus determinaciones, existe la posibilidad de poder usarlo por su alta sensibilidad y especificidad, ya que distingue a la Griseofulvina de sus metabolitos que no presentan actividad fungicida.

### II.3.3. Método de Cromatografía de Capa Fina (C.C.F.).

Garceu, Bresson y col. (39) lograron cuantificar Griseofulvina y el metabolito 6-desmetilgriseofulvina, tanto en plasma como en orina utilizando C.C.F., junto con un procedimiento fluorométrico.

El método consistió en extraer con éter la Griseofulvina del plasma, tomar una alícuota de la fase etérea, evaporar y re-

disolver en cloroformo, la solución se aplica en la placa cromatográfica junto con un estándar de Griseofulvina de concentración conocida; la cromatografía se desarrolla en un sistema de disolventes de éter-acetona (80:21).

La 6-desmetilgriseofulvina fué extraída de la orina con benceno previa acidificación con HCl 0.1N; se aplicó una alícuota de 10 ml de la fase orgánica en la placa cromatográfica, la cual se desarrolló en un sistema de disolventes: cloroformo-éter-acetona-ácido acético (65:20:15:05).

La cuantificación se realizó de acuerdo a la fluorescencia de las manchas en un espectrodensitómetro. Las concentraciones de Griseofulvina y de metabolito encontradas en plasma y en orina se encontraban en el rango de 20 ng- 1.5 mcg/ml y de 10-80 mcg/ml respectivamente.

Este método fue utilizado para realizar estudios de biodisponibilidad.

II.3.4. ---Método Cromatografía de Gas-Líquido. La Cromatografía Gas-Líquido es esencialmente una técnica de separación. En esta técnica la muestra es llevada através de la columna por un gas inerte, pasando por el soporte que es de un material inerte cubierto por un solvente no volátil y que constituye la fase líquida.

El disolvente retarda selectivamente el paso de los constituyentes de la muestra de acuerdo a su coeficiente de distribución y de esta manera se separan los compuestos, los cuales se manifiestan en un detector.

En 1966 Iguchi(17) reportó un método de cuantificación de

Griseofulvina en comprimidos y suspensiones por el método de C.G.L. En él se utilizó el siguiente equipo: detector de ionización de llama de hidrógeno; columna de acero inoxidable en forma de U de 150 cm de largo x 4 mm de diámetro interno, empacada con SE-30 al 1.5% sobre Cromosorb W, 80-100 mallas.

Margosis (18) efectuó un análisis similar en productos farmacéuticos comerciales y el estándar de F.D.A. con el siguiente equipo y condiciones: detector de ionización de llama; columna de vidrio enrollada, de 3 ft de largo x 4 mm de diámetro interno, empacada con OV-17 al 1% sobre Cromosorb Q de 100 -120 mallas; temperatura de la columna 245°C, temperatura del inyector 260°C; temperatura del detector 260°C; flujo del gas acarreador (helio) 60 ml/min; hidrógeno 22 psi., aire 30 psi., estándar interno tetrafenilciclopentadienona. Posteriormente, demostró la validez y aplicabilidad del método en un estudio donde participaron 24 laboratorios (19). En este caso las condiciones a las que trabajaron los laboratorios fueron variables, pero en términos generales se utilizaron columnas de un rango de eficiencia de 300 a 2000 platos teóricos con promedio de 993 ± 37 platos/m. Las columnas utilizadas fueron OV-17; y SE-30 empleando como estándar interno tetrafenilciclopentadienona.

Estos estudios sirvieron para desarrollar otro método para determinar Griseofulvina en plasma (20). Dicho método es rápido, simple, específico, exacto y confiable aún cuando en la muestra se encuentren compuestos estructuralmente relacionados. Las condiciones y equipo utilizados fueron: Cromatógrafo de Gases con detector de captura de electrones; columna de vidrio de 152.4 cm (5ft) de largo x 4 mm de diámetro interno, empacada con OV-17 al 3% sobre Cromosorb W de malla 80-100. La temperatura del detector 330°C, temperatura de la columna 270°C; temperatura del



inyector  $310^{\circ}\text{C}$ ; gas acarreador ( argón-metano, 90:10); con flujo de 150 ml/min; rango de 10 con factor de atenuación 16x.

Mediante el método de C.G.L. fue posible la determinación de Griseofulvina en piel(14), lo cual es importante, ya que este fármaco es un agente antifúngico efectivo en infecciones superficiales de la piel.

En términos generales, el método consiste en efectuar extracciones generalmente con éter de las muestras de plasma o piel - obtenidas. Se toma una alícuota de la fase etérea y se evapora a sequedad. La muestra desecada se redisuelve en un volumen adecuado de benceno conteniendo un estandar interno. De esta solución se toma una muestra del orden de microlitros y se inyecta al cromatógrafo. Se elabora una curva estandar empleando diferentes concentraciones de Griseofulvina patrón a las cuales se les inyecta el mismo volumen de estandar interno que las muestras problema. Se grafica la relación de áreas o alturas de los picos de la Griseofulvina y del estandar interno contra concentraciones. La relación obtenida para la muestra problema se interpola y se obtiene la concentración en plasma o piel. Se asume que la recuperación es cuantitativa.

Para la detección de la Griseofulvina se puede hacer uso de dos tipos de detectores que son el de ionización de llama y el de captura de electrones. Para los estudios en plasma y piel (14,20) se prefiere el detector de captura de electrones, ya que es más sensible y específico para la Griseofulvina. Pudiéndose detectar cantidades a nivel de picogramos.

El detector de captura de electrones tiene un rango lineal

corto. En el estudio de Shah y col. (14) se encontró un rango - entre 100pg -7 ng. En este estudio se utilizaron 50 ng de diaze pam como patron interno, con un tiempo de retención de casi 3 - min. Para la Griseofulvina el tiempo de retención fue aproximadamente 8 min, en este caso el equipo y condiciones a las que se trabajó fueron: Detector de captura de electrones; columna de - vidrio OV-17 al 3% sobre Cromosorb W, con 1.83 m de largo x 0.3 cm de diámetro; la temperatura de la columna 270°C; temperatura del inyector 310°C; temperatura del detector 340°C; gas acarrea dor argón-metano (95:5) con flujo de 40 ml/min. La sensibilidad fue del rango de 10 con un factor de atenuación de 16x.

En las condiciones utilizadas el metabolito principal de la Griseofulvina tiene un tiempo de retención mayor y se eluye como una banda muy plana casi indistinguible a las concentraciones correspondientes.

Según los resultados de los métodos anteriores la cantidad mínima detectable en los distintos métodos son:

Método	Cantidad mínima de tectable en plasma mcg/ ml.	Límite superior en plasma. mcg/ml.
Espectrofluorométrico	0.10	2.5
Microcultivo	0.01	---
C.G.L.(Espectrodensitómetro)	0.02	80.0
C.G.L.(Ionización).	0.05	1.5
C.G.L.( C. de electrones)	100 pg.	7.0 ng.

II.3.5.Determinación de la 6-desmetilgriseofulvina: La medición de 6-desmetilgriseofulvina en muestras de orina, ofrece un método conveniente para los estudios de biodisponibilidad de la Griseofulvina (15,28), ya que sólo una pequeña proporción (menos del 0.1%) aparece en forma inalterada, siendo la 6-desmetilgriseofulvina el principal metabolito. Este metabolito fluoresce con la misma energía de activación (315nm) y con el mismo máximo de fluorescencia. La intensidad máxima de fluorescencia es a pH 2.4 siendo prácticamente nula a pH 7.

La mayor parte del metabolito se excreta en forma libre aún que también existe en forma conjugada como glucorónido, así para obtener el total del metabolito excretado es necesario hidrolizar el glucorónido con la enzima glucoronidasa.

Rowland y col. (15) reportaron un método espectrofluorométrico para la determinación de la 6-desmetilgriseofulvina en orina. En términos generales el método consiste en tomar 2 ml de orina, adicionar 0.1 ml de amortiguador de citratos pH 3.9 y 10 ml de una mezcla de ciclohexano, cloruro de metileno (1:1). Se agita y se centrifuga; se toma una alícuota de la capa orgánica y se hace una segunda extracción con el amortiguador de fosfatos pH7.9, se agita y se centrifuga. La fase orgánica se desecha y la capa acuosa se pipetea en dos tubos, uno conteniendo amortiguador de Mc. Ivaine (Ácido Cítrico, Fosfato Disódico) y otro conteniendo 0.2 ml de Acido Clorhídrico 5N. La absorbancia de la solución ácida se determina a 327 nm, la cual se interpola en una curva estandar en un rango de 0.1-10 mcg/ml. La concentración de glucorónido se determina como la diferencia entre las concentraciones de 6-desmetilgriseofulvina antes y después de la incubación de la muestra de orina durante varias horas a 37°C con 100 unidades de glucoronidasa en 1 ml de amo-

tiguador de fosfatos.

El pH de la primera extracción permite la recuperación cuantititativa de la 6-desmetilgriseofulvina y reduce interferencias - debidas a constituyenes de la orina.

III.- PARTE EXPERIMENTAL .

### III.1 DETERMINACION DE GRISEOFULVINA EN ORINA POR C.G.L UTILIZAN- DO DETECTOR DE IONIZACION DE LLAMA.

#### III.1.1 Material y Equipo.

Cromatógrafo de Gases marca Varian, modelo 3700.

Columna: OV-17 al 1.5% en Chromosorb W, 80/100 mallas, columna\_ de vidrio de 200 cm de largo, 0.25 pulgadas de diámetro externo.

Condiciones: temperatura de la columna: 300°C; temperatura del - inyector: 320°C; temperatura del detector: 330°C; presión del gas acarreador: 39 psi., con 15 ml/min de velocidad. Sensibilidad —  $10^{-11}$ ; velocidad de la carta: 0.625 cm/min.

#### III.1.2. Reactivos:

Eter etílico (R.A.) Baker.

Cloroformo (R.A. tridestilado) Baker.

Diazepam (U.S.P. lote 6226702, clave 1018001.

Griseofulvina (U.S.P.) lote 2110 de los laboratorios Glaxo de Mex.

Tween 80.

Cloruro de sodio (R.A.) Baker.

Acetona (R.A.) Baker.

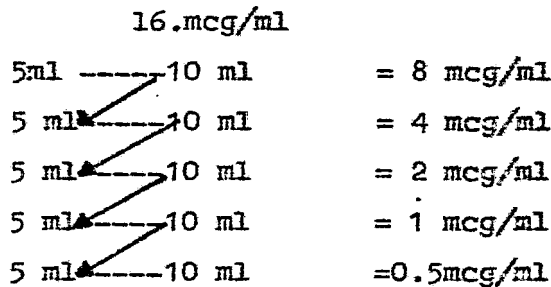
III.1.3 Soluciones: Estandar interno de Diazepam ( Solución de 80 mcg/ml ). Curva estandar de Griseofulvina en cloroformo a concen- traciones de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 mcg/ml.

Solución saturada de Cloruro de sodio.

III.1.4- Preparación de las diluciones: Se pesaron 20 mg. de Gri- seofulvina y se aforarón con Cloroformo a 100 ml. obteniendose -- una concentración de 200 mcg/ml.

De esta solución se tomaron 2 ml. y se colocaron en un matraz volumétrico de 25 ml., esta alícuota se evaporó a sequedad con  $H_2$ .

posteriormente se le agregaron 0.5 ml de acetona y 0.1 ml de -  
tween 80 para disolver, se aforó al volumen con orina, para ob-  
tener una concentración de 16.0 mcg/ml. De esta solución se hi-  
cieron las siguientes diluciones:



La curva estandar se preparó de la misma manera partien-  
do de la solución clorofórmica de 200 mcg/ml, estas diluciones  
se hicieron en cloroformo.

III.1.5. Método de extracción: Para hacer la extracción se tomó  
1 ml de las : soluciones problema, se les añadió 1 ml de solución  
saturada de cloruro de sodio y se extrajo con 10 ml de éter etí-  
lico, se agitó por un minuto, se dejó separar las capas, se to-  
mo una alícuota de 5 ml de la fase etérea y se colocó en otro -  
tubo donde se evaporó a sequedad. Se le agregaron 45 mcl de es-  
tandar interno. Las muestras se tomaron por cuadruplicado apli-  
cándoles el mismo tratamiento a todas.

Para la curva estandar (diluciones en cloroformo) no se hi-  
zo extracción, solamente se tomó la alícuota de 1 ml y se colo-  
có en un tubo donde se evaporó a sequedad agregándole al mismo\_  
tiempo el estandar interno.

Las muestras se redisolviercn en 45 mcl de cloroformo en -  
el momento de hacer la inyección. De cada tuto se hicieron tres  
inyecciones, con el fin de observar la reproducibilidad y la va-  
riación en cada inyección, posteriormente se determinó el prome

dio de la relación de alturas de las tres.

Para cada curva problema se inyectó su correspondiente curva estandar.

Los tiempos de retención a las condiciones antes mencionadas para el estandar interno y para la Griseofulvina fueron - 3.0 y 6.8 minutos respectivamente. Se encontró que los compuestos son estables a estas condiciones, ya que al inyectarse cada uno por separado aparece solamente el pico correspondiente al compuesto.

III.1.6. Estabilidad: Para esta prueba se preparó una solución de 4 mcg/ml de Griseofulvina disueltos en orina; esta solución se dividió en cinco tubos, con el fin de que permanecieran en congelación hasta el momento de hacer la extracción. Las muestras se descongelaron y se extrajeron a los siguientes tiempos: cero, segunda, tercera y cuarta semana.

III.1.7. Coeficiente de Variación en la Extracción: En esta prueba se hizo el análisis con una sola concentración (2 mcg/ml) de Griseofulvina en orina. Se prepararon cuatro muestras de acuerdo al método de extracción descrito en la sección III.1.5.



III.2. DETERMINACION DE GRISEOFULVINA EN PLASMA POR C.G.L. UTILIZANDO DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES.

III.2.1. Material y Equipo:

Cromatógrafo de Gases marca Varian, modelo 3700.

Columna de vidrio de 200 cm de largo y de 0.25 pulgadas de diámetro externo. Columna OV-17 al 1.5 % en Chromosorb W, 80/100 - mallas. Condiciones: temperatura de la columna: 300°C, temperatura del inyector: 320°C, temperatura del detector: 330°C. Velocidad del gas acarreador: 15 ml/min, presión del gas acarreador (N<sub>2</sub>) 42 psí. Sensibilidad: de 10; velocidad de la carta 0.625 cm/min.

III.2.2. Reactivos:

Eter etílico (R.A.) Monterrey.

Benceno (R.A.) Baker.

Diazepam (U.S.P.) lote 6226702, clave 1108001.

Griseofulvina (U.S.P.) lote 2110 de los laboratorios Glaxo de Mex.

Cloruro de sodio (R.A.) Baker.

III.2.3. Soluciones: Estandar interno: Solución de Diazepam (40 ng/ml). Curva de Griseofulvina en plasma de concentraciones de: 15.6, 31.12, 62.25, 125, 250, 500, 1000 ng/ml.

Solución saturada de Cloruro de sodio.

III.2.4. Preparación de las diluciones: Se pesaron 0.005 g de Griseofulvina y se aclararon con benceno a 25 ml, obteniéndose una concentración de 200 ng/ml.

De la solución anterior se tomó 0.1 ml y en un matraz volumétrico de 10 ml se evaporó el benceno hasta sequedad, redisolviendo y aforando posteriormente con plasma; para obtener así una concentración de 2 mcg/ml.

De esta solución se hicieron las siguientes diluciones:

2 mcg/ml		
5 ml	→ 10 ml	= 1000 ng/ml
5 ml	↘ 10 ml	= 500 ng/ml
5 ml	↘ 10 ml	= 250 ng/ml
5 ml	↘ 10 ml	= 125 ng/ml
5 ml	↘ 10 ml	= 62.5 ng/ml
5 ml	↘ 10 ml	= 31.2 ng/ml
5 ml	↘ 10 ml	= 15.1 ng/ml

III.2.5.Método de Extracción. El procedimiento de extracción es semejante al que se hizo para el método en orina. Se tomó una alícuota de 1 ml de cada una de las diluciones; se le adicionó 1 ml de solución saturada de cloruro de sodio y se extrajo con 10 ml de éter, agitando por un minuto. De la capa etérea se tomó una alícuota de 5 ml la cual se colocó en un tubo donde se evaporó a sequedad, agregándole al mismo tiempo 0.025 ml de estándar interno. Las muestras se redisolvieron con 0.2 ml de benceno en el momento de hacer el análisis.

Este procedimiento se realizó para preparar ocho curvas; en ellas se analizaron los siguientes parámetros: linealidad, reproducibilidad, cantidad mínima detectable; los resultados se presentan en la sección IV.1.1.

Los tiempos de retención en las condiciones antes mencionadas fueron: 3.5 y 7.5 min para estándar interno y Griseofulvina respectivamente.

III.2.6. Variación en la Extracción: Para medir este parámetro se hizo el análisis con una sola concentración (125 ng/ml) de Griseofulvina en plasma. Se prepararon cinco muestras de acuerdo al método de extracción descrito en la sección III.2.5, las cuales se inyectaron de la misma manera que todas las anteriores.

III.2.7. Estabilidad: La prueba tiene como finalidad observar si la Griseofulvina sufre alguna degradación que se vea reflejada en un cambio de concentración a través de un cierto tiempo.

Para esta prueba se preparó una solución de 250 ng/ml de Griseofulvina disueltos en plasma; esta solución se dividió en cuatro tubos, los cuales se mantuvieron en congelación hasta el momento de hacer la extracción. Las muestras se descongelaron y se extrajeron a los sig. tiempos: cero, segunda, tercera y cuarta semana; estas se evaporaron a sequedad y se redisolviéron en benceno en la última semana para ser inyectadas. El método de extracción utilizado fué el que se presenta en la sección III.2.5

#### IV. RESULTADOS.

#### IV.1. DETERMINACION DE GRISEOFULVINA EN ORINA UTILIZANDO EL DETECTOR DE IONIZACION DE LLAMA.

En la figura No. 1 se presenta el cromatograma obtenido al realizar la determinación de Griseofulvina en orina utilizando detector de ionización de llama; en el cual se observan los picos del disolvente, del estándar interno: diazepam y el de la Griseofulvina. Los tiempos de retención obtenidos conforme a las condiciones mencionadas en la sección III.1.1 son 3 minutos para el estándar interno y 6.8 minutos para la Griseofulvina.

Para la cuantificación de Griseofulvina se tomó en consideración el valor obtenido en la relación de alturas de los picos de la Griseofulvina y el estándar interno para cada concentración.

$R_h =$  Altura del pico de la Griseofulvina  $\div$  altura del pico del estándar interno.

IV.1.1. Linealidad: En las tablas 1- a la 4- se presentan los resultados obtenidos al realizar las determinaciones correspondientes de Griseofulvina en orina, las cuales se encuentran representadas gráficamente en las figuras 2-5.

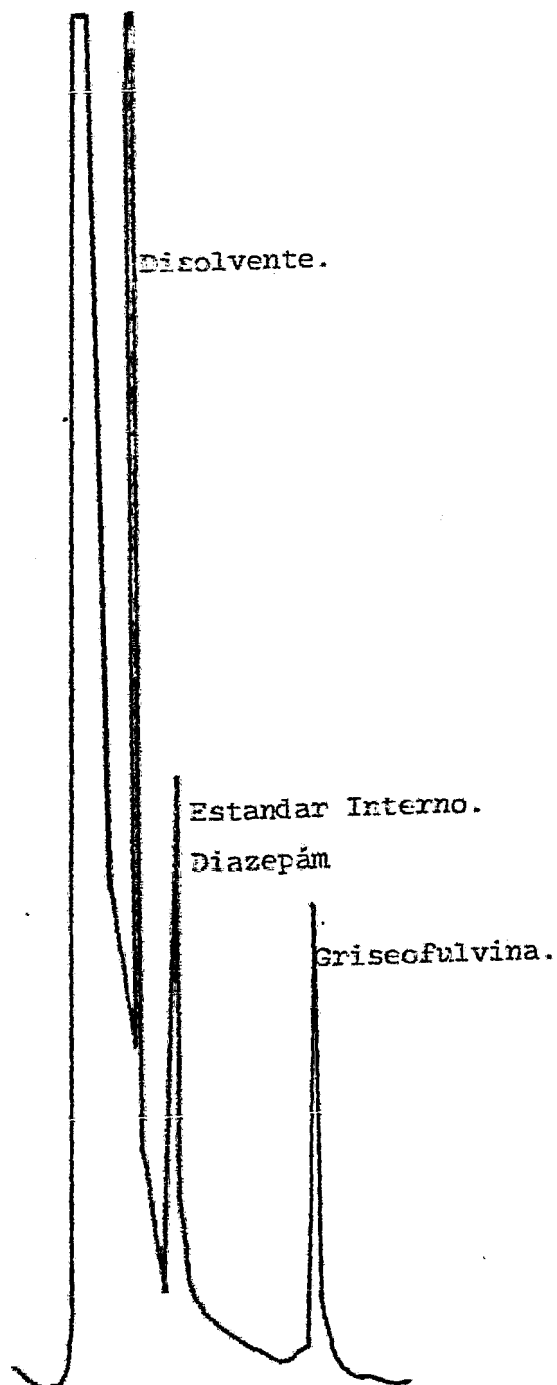


Figura No. 1.

Cromatograma de Griseofulvina en orina utilizando detector de ionización de llama.  
Concentración de Griseofulvina = 3 mcg/ml.  
Atenuación = 4x  
Rango de sensibilidad =  $1 \times 10^{-11}$

Tabla No. 1

Determinación No. 1 de Griseofulvina en orina  
utilizando detector de ionización de llama.

Concentración mcg/ml	Estandar de Referencia Rhs.	Problema Rhs.
0.5	0.00924	0.0042
1.0	0.0184	0.0090
2.0	0.0403	0.0182
4.0	0.0813	0.0386
8.0	0.1502	0.0728
16.0	0.2998	0.1501

Tabla No. 2

Determinación No. 2 de Griseofulvina en orina  
utilizando detector de ionización de llama.

Concentración mcg/ml	Estandar de Referencia Rhs.	Problema Rhs.
0.5	0.0057	0.0026
1.0	0.0126	0.0060
2.0	0.0376	0.0170
4.0	0.0768	0.0349
8.0	0.1508	0.0708
16.0	0.3025	0.1519



Tabla No. 3

Determinación No. 3 de Griseofulvina en orina  
utilizando detector de ionización de llama.

Concentración mcg/ml	Estandar de Referencia Rhs,	Problema. Rhs.
0.5	0.0099	0.0047
1.0	0.0194	0.0087
2.0	0.0343	0.0169
4.0	0.0624	0.0296
8.0	0.1519	0.0736
16.0	0.2898	0.1432

Tabla No.4

Determinación No. 4 de Griseofulvina en orina  
utilizando detector de ionización de llama.

Concentración mcg/ml	Estandar de Referencia Rhs.	Problema. Rhs.
0.5	0.0100	0.0048
1.0	0.0173	0.0079
2.0	0.0389	0.019
4.0	0.03822	0.0382
8.0	0.1558	0.0776
16.0	0.3048	0.1520

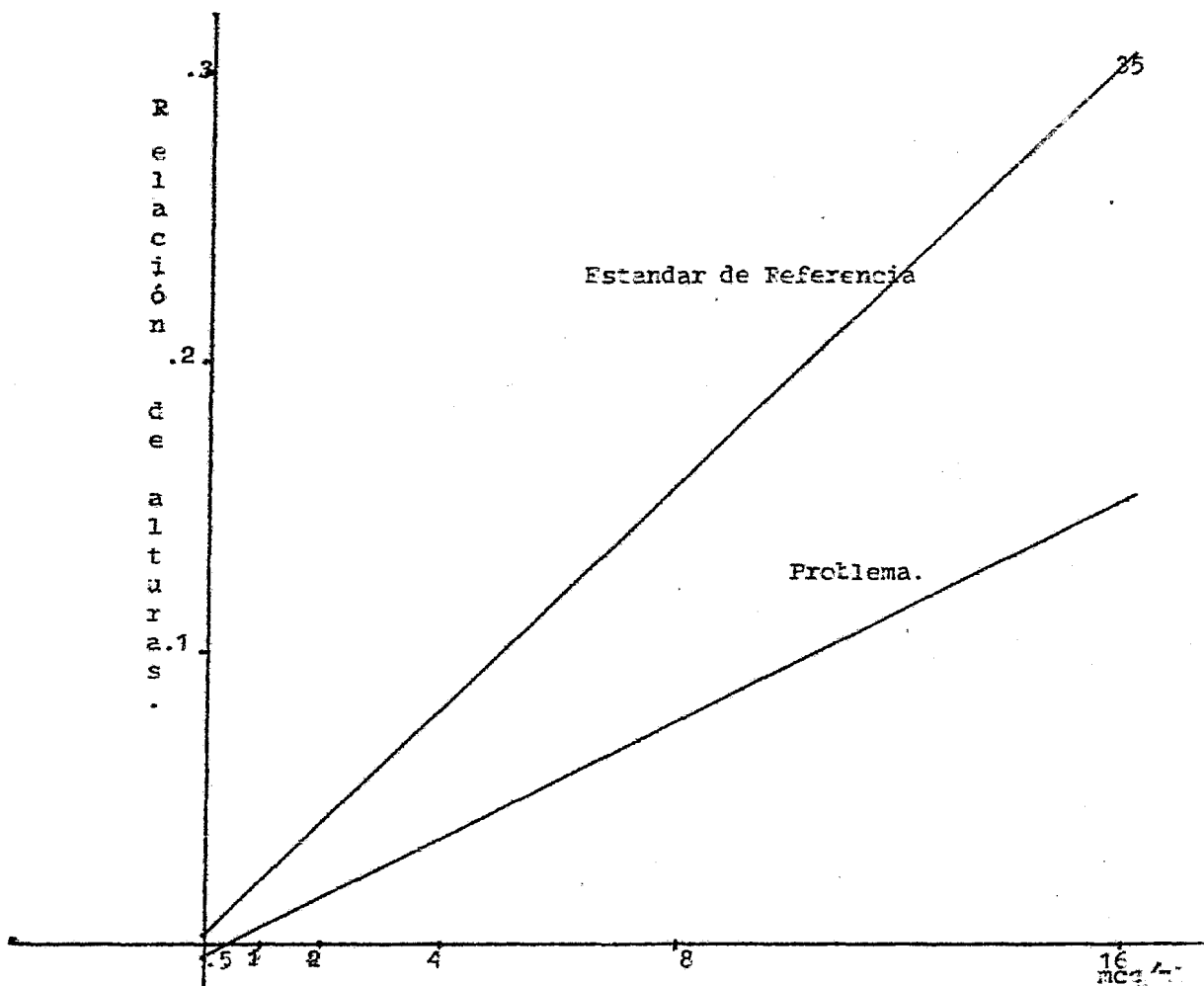


Figura No. 2

Determinación de Griseofulvina en orina utilizando detector de ionización de flama.

Datos de la tabla No. 1.

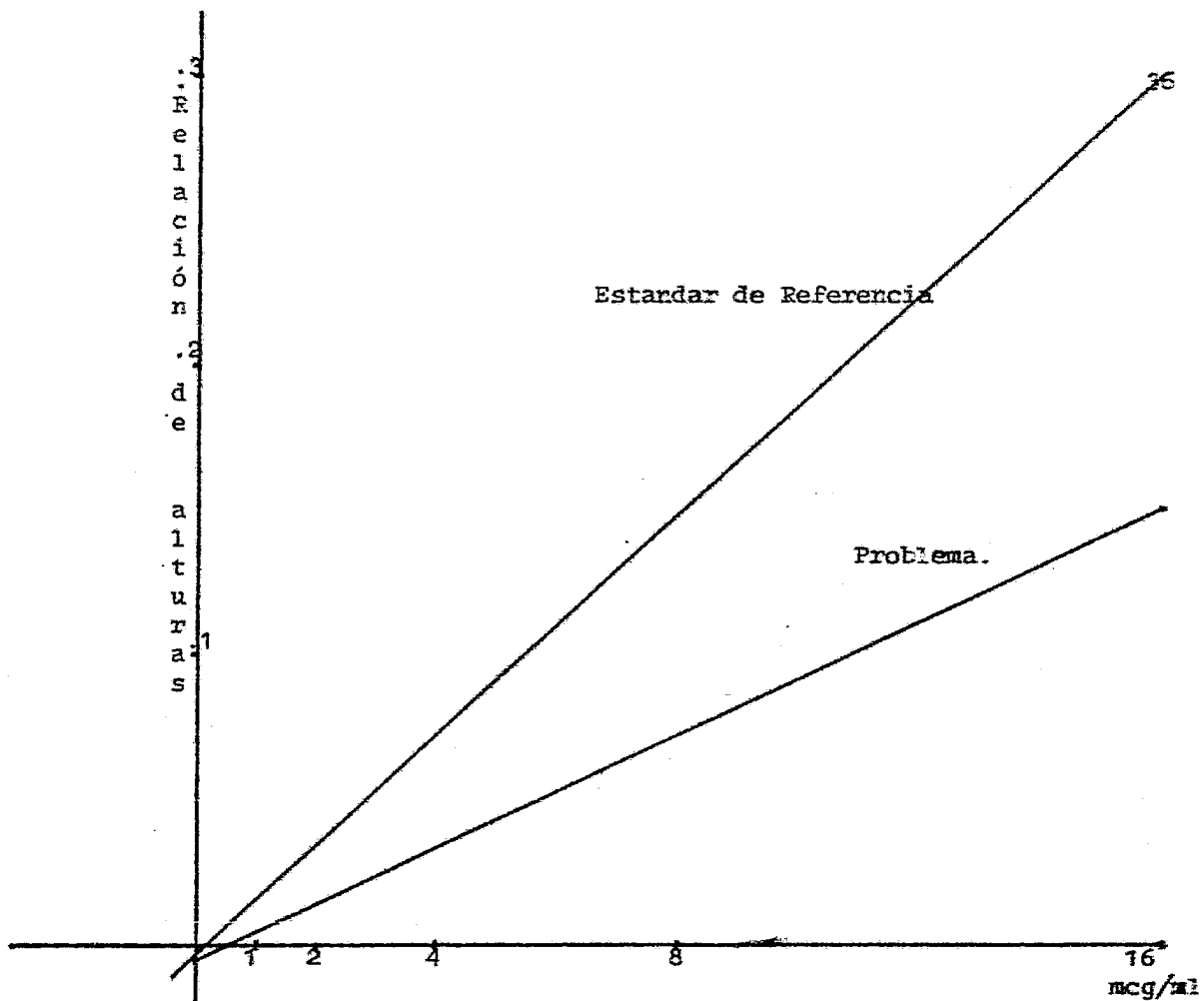


Figura No.3  
 Determinación de Griseofulvina en orina utilizando detector de ionización de llama.  
 Datos de la tabla No.2

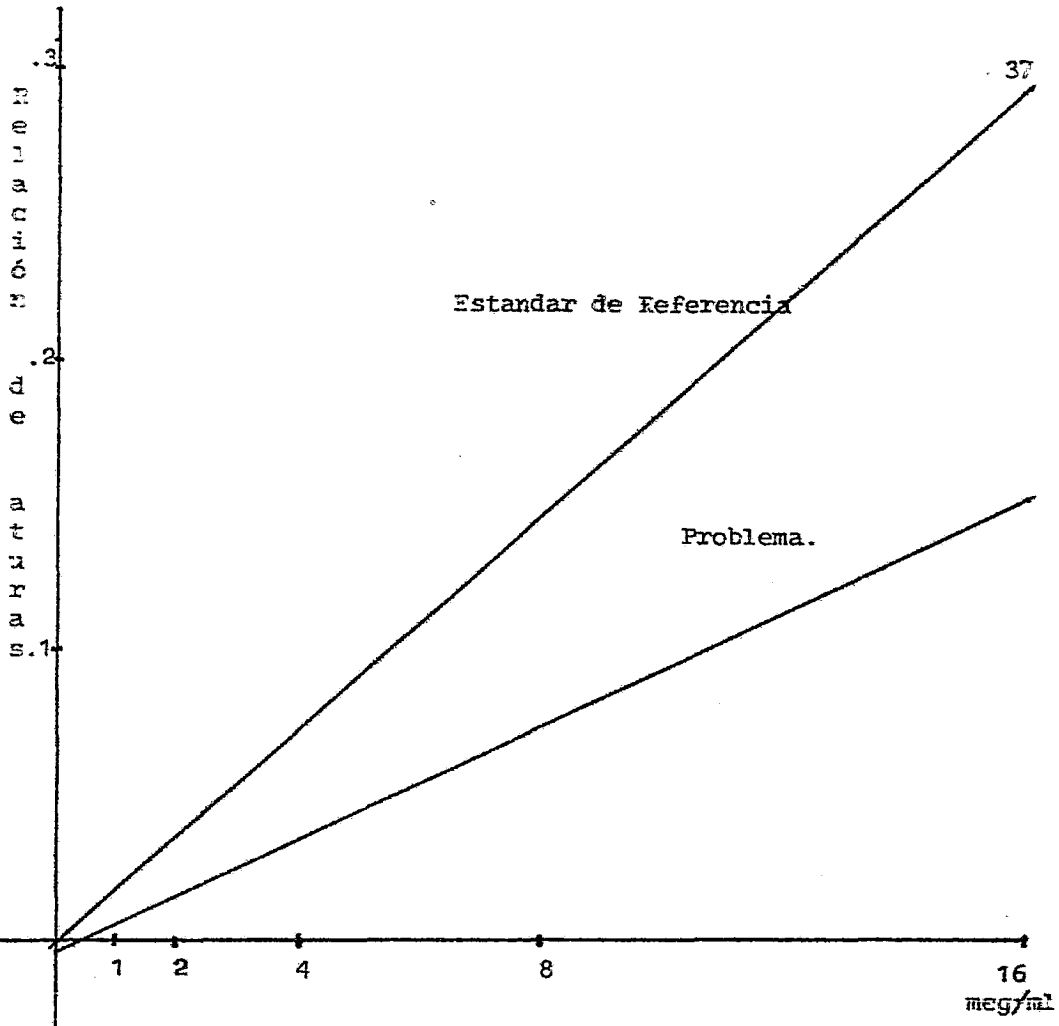


Figura No. 4

Determinación de Griseofulvina en orina utilizando detector de ionización de llama.  
 Linealidad de los datos de la tabla No. 3.

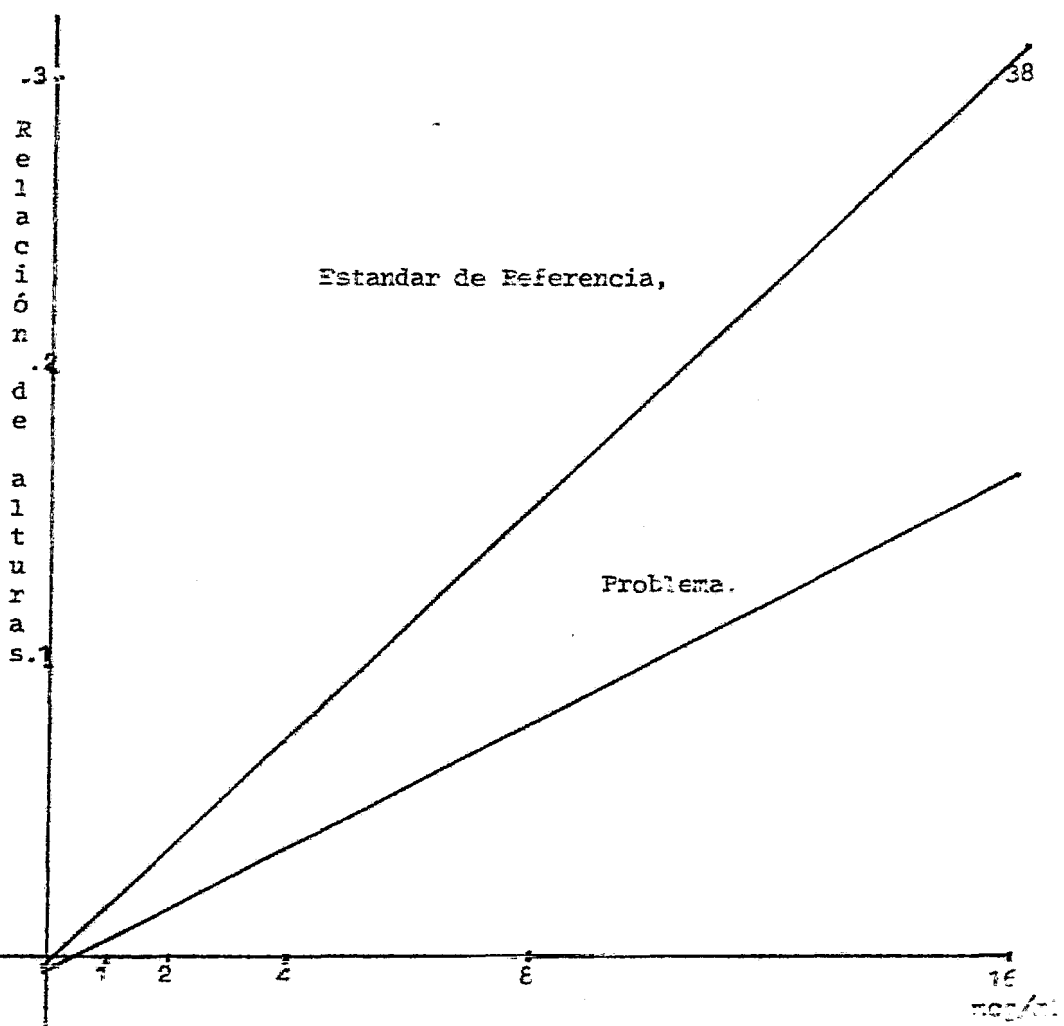


Figura No. 5  
 Determinación de Griseofulvina en crina utilizando detector de ionización de llama.  
 Datos de la tabla No.4

De acuerdo a los resultados de las tablas No. 1,2,3 y 4 se calcularon las pendientes, interceptos y coeficientes de correlación de los cuatro experimentos realizados; tanto de las curvas de referencia como de los problemas. Los datos se exponen en la tabla No. 5. Así mismo observamos gráficamente la linealidad de estos datos en las figuras 6 y 7 donde se presentan -- por separado las cuatro curvas de referencia y las cuatro curvas de los problemas.

Tabla No.5

Determinación del Coeficiente de Correlación, Pendientes, Interceptos de las curvas Estandar y Problema de Griseofulvina utilizando detector de ionización de llama.

Experimentos No.

		I	II	III	IV
E s t a n d a r	$r^2$	0.999	0.999	0.997	0.999
	r	0.999	0.999	0.999	0.999
	m	0.019	0.019	0.018	0.019
	b	0.002	0.003	0.001	0.001
P r o b l e m a	$r^2$	0.999	0.999	0.997	0.999
	r	0.999	0.999	0.999	0.999
	m	0.009	0.010	0.009	0.10
	b	-0.004	-0.004	-0.001	-0.003

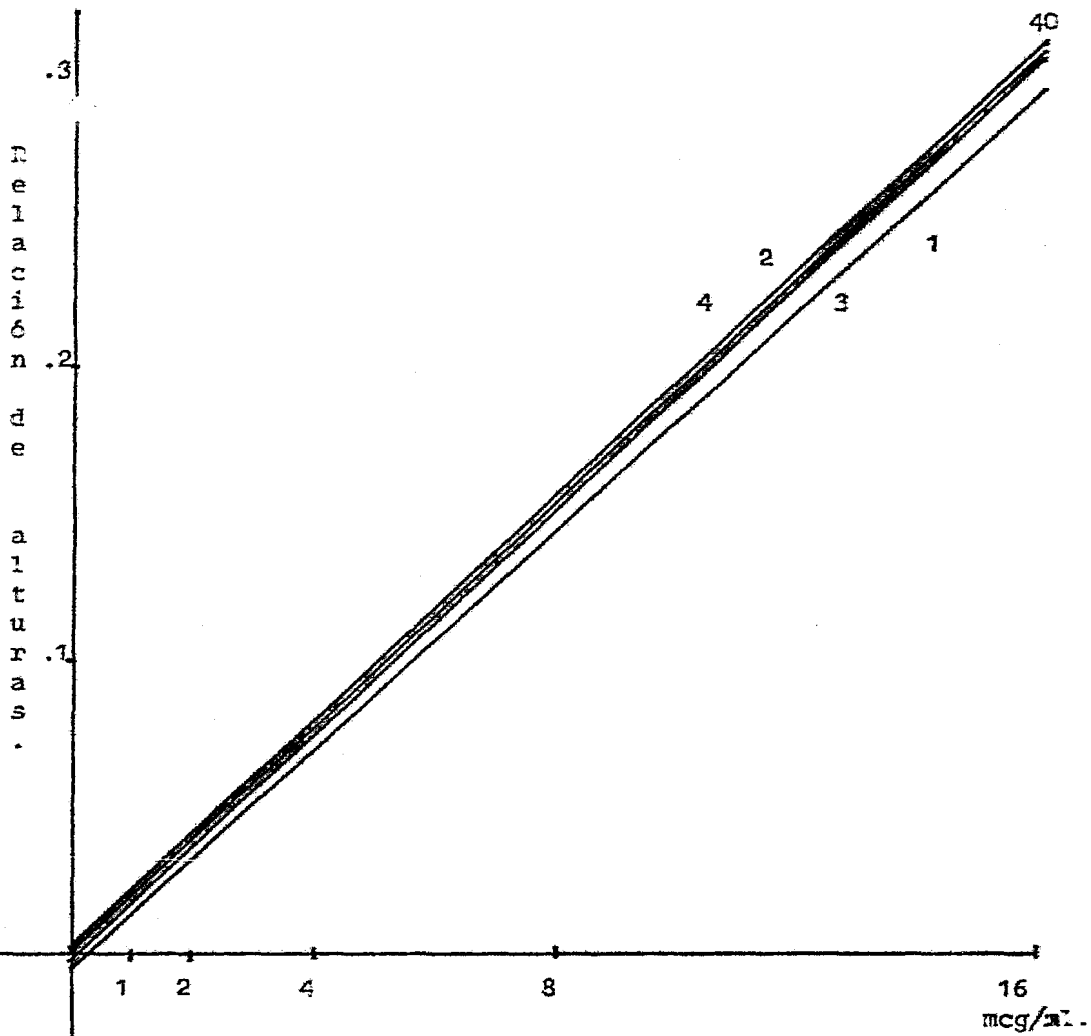


Figura No. 6  
 Linealidad de las cuatro curvas de Referencia en  
 la determinación de Griseofulvina en orina; utili-  
 zando detector de ionización de llama.



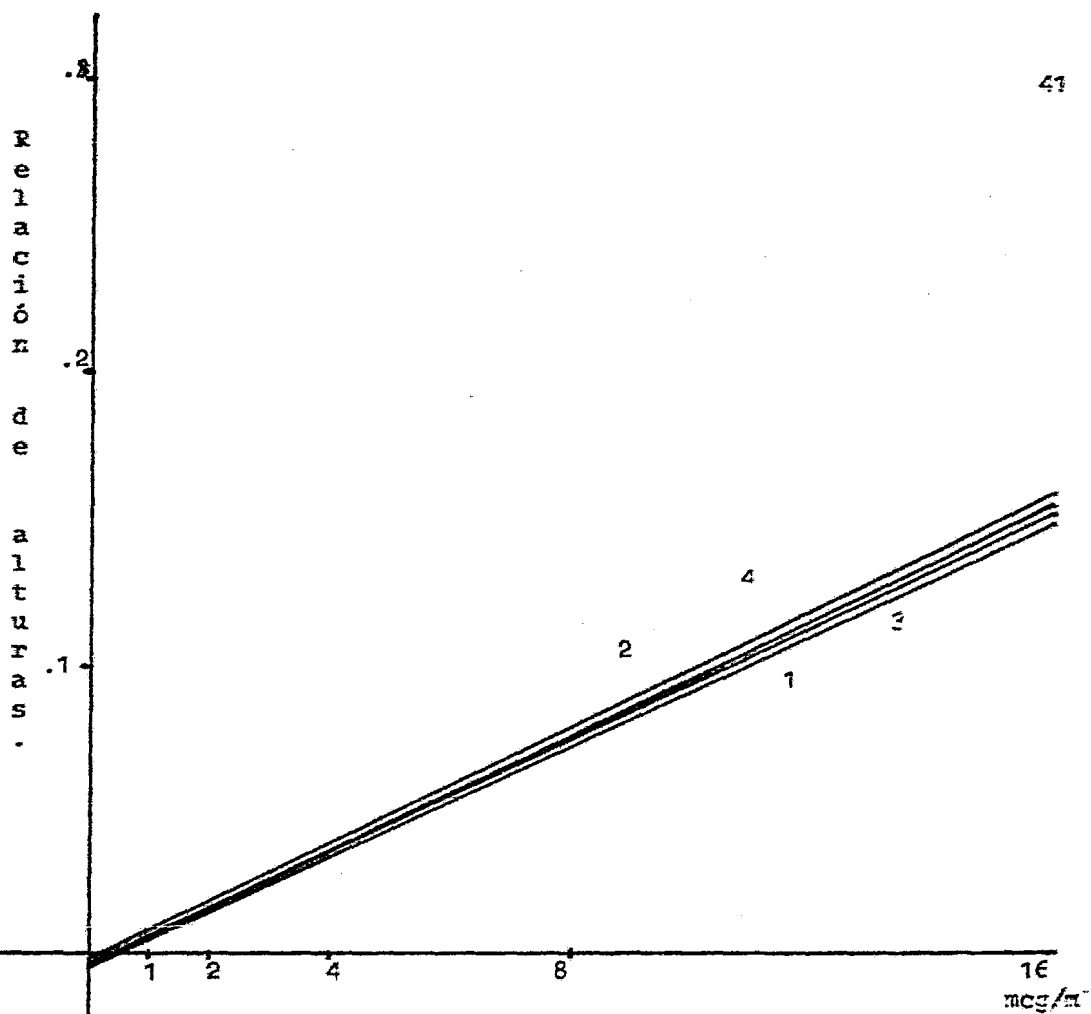


Tabla No.7

Linealidad de las cuatro curvas Problema en la determinación de Griseofulvina en orina; utilizando detector de ionización de llama.

IV.1.2. Determinación de la Concentración Real y % de Extracción de Griseofulvina en orina.

Los datos que se presentan en las tablas No. 6,7,8 y 9 corresponden a los resultados obtenidos al interpolar en cada curva de referencia, los datos del problema correspondiente a cada experimento, estos son los datos obtenidos de las tablas 1-4.

En donde X = concentración del Estandar de Referencia.

Y = Relación de alturas: Estandar de Referencia  $\div$  Estandar interno =  $hR/hSi$ .

Y' = Relación de alturas del Problema: Problema  $\div$  Estandar interno =  $hP/hSi$ .

X' = Concentración Real.

La concentración real se obtuvo al interpolar la altura del problema (Y) en la curva de referencia ( $X_0, Y_0$ ); ( $X_1, Y_n$ ) - obteniéndose X'.

El % de Extracción se obtuvo al relacionar la concentración del Estandar de Referencia con la concentración Real del Problema.

$$\frac{(X')(100) (2)}{X} = \% \text{ de Extracción.}$$

El cálculo se multiplica por 2 ya que en la extracción, la alícuota que se toma para la curva de referencia corresponde a la mitad de la muestra del problema.

Así mismo los datos se pueden observar representados grá

ficamente en las figuras No. 8, 9, 10 y 11, donde se graficó con  
centración Vs. Relación de alturas

Tabla No. 6

Obtención de la Concentración Real y del % de Ex-  
tracción por la interpolación de los datos presen-  
tados en la tabla No. 1.

X	Y	Y' Interpolado	Concentración. Real	% de Extracción
mcg/ml	hF/hSi	hF/hSi = Y'	mcg/m <sup>3</sup>	%
0.5	0.0092	0.0042	0.2225	89.0
1.0	0.0184	0.0090	0.4841	96.03
2.0	0.0403	0.0182	0.9758	97.58
4.0	0.0813	0.0386	2.0702	103.51
8.0	0.1508	0.0728	3.9056	97.64
16.0	0.2998	0.1501	8.0463	100.58

Tabla No. 7

Obtención de la Concentración Real y del % de Extracción por la interpolación de los datos presentados en la tabla - No. 2.

X	Y	Y'	Concentración	% de Extrac-
mcg/ml	hR/hSi	Interpolado	Real	ción.
		hP/hSi = Y'	mcg/ml = X'	%
0.5	0.0057	0.0026	0.2346	93.86
1.0	0.0126	0.0059	0.4705	94.11
2.0	0.0376	0.0170	0.8945	89.45
4.0	0.0768	0.0349	1.8332	91.66
8.0	0.1508	0.0708	3.7132	92.83
16.0	0.3025	0.1519	7.9557	99.44

Tabla No. 8

Obtención de la Concentración Real y del % de Extracción por la interpolación de los datos presentados en la tabla No. 3.

X	Y	Y' Interpolado	Concentración Real	% de Extracción
mcg/ml	hR/hSi	hP/hSi = Y'	mcg/ml = X'	%
0.5	0.0099	0.0047	0.2575	103.03
1.0	0.0194	0.0087	0.4772	95.45
2.0	0.0343	0.0169	0.9247	93.47
4.0	0.0623	0.0296	1.628	80.83
8.0	0.1515	0.07367	4.0243	100.60
16.0	0.2898	0.1432	7.8264	97.83

Tabla No. 9

Obtención de la Concentración Real y del % de Extracción por la interpolación de los datos presentados en la tabla No. 4.

X	Y	Y'	Concentración	% de Extracción
		Interpolado	Real	
mcg/ml	hR/hSi	hP/Si= Y'	mcg/ml=X'	%
0.5	0.0100	0.0048	0.2483	99.38
1.0	0.0173	0.0079	0.4165	83.3
2.0	0.0389	0.0197	0.9980	99.8
4.0	0.0822	0.0382	2.0033	100.16
8.0	0.1558	0.0776	4.0705	101.76
16.0	0.3048	0.1530	7.769	99.61

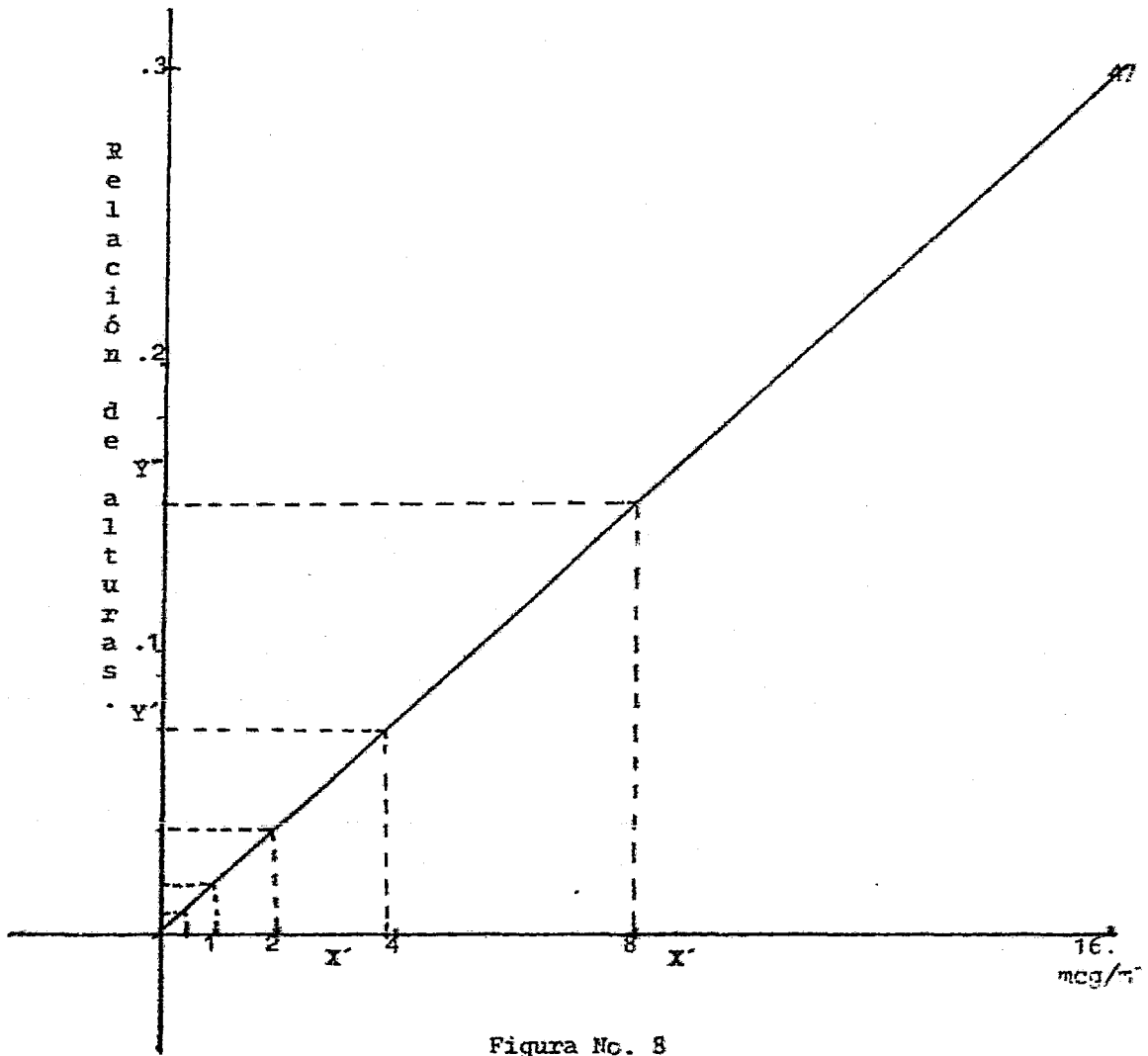


Figura No. 8

Determinación de la Concentración Real de Griseofulvina en orina por la interpolación en la curva de Referencia.

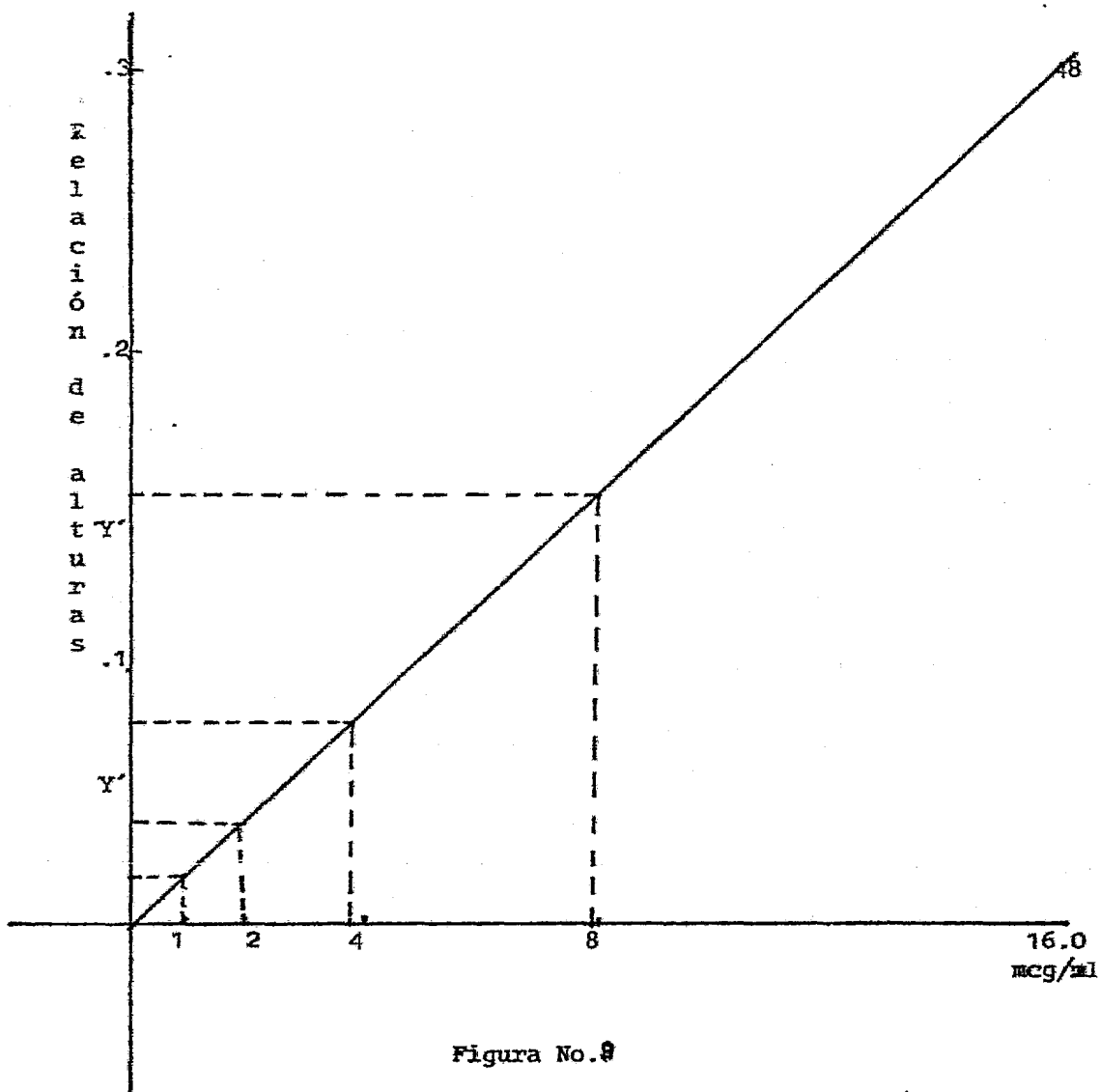


Figura No. 9

Determinación de la Concentración Real de Griseo fulvina en orina por la interpolación en la curva de Referencia.



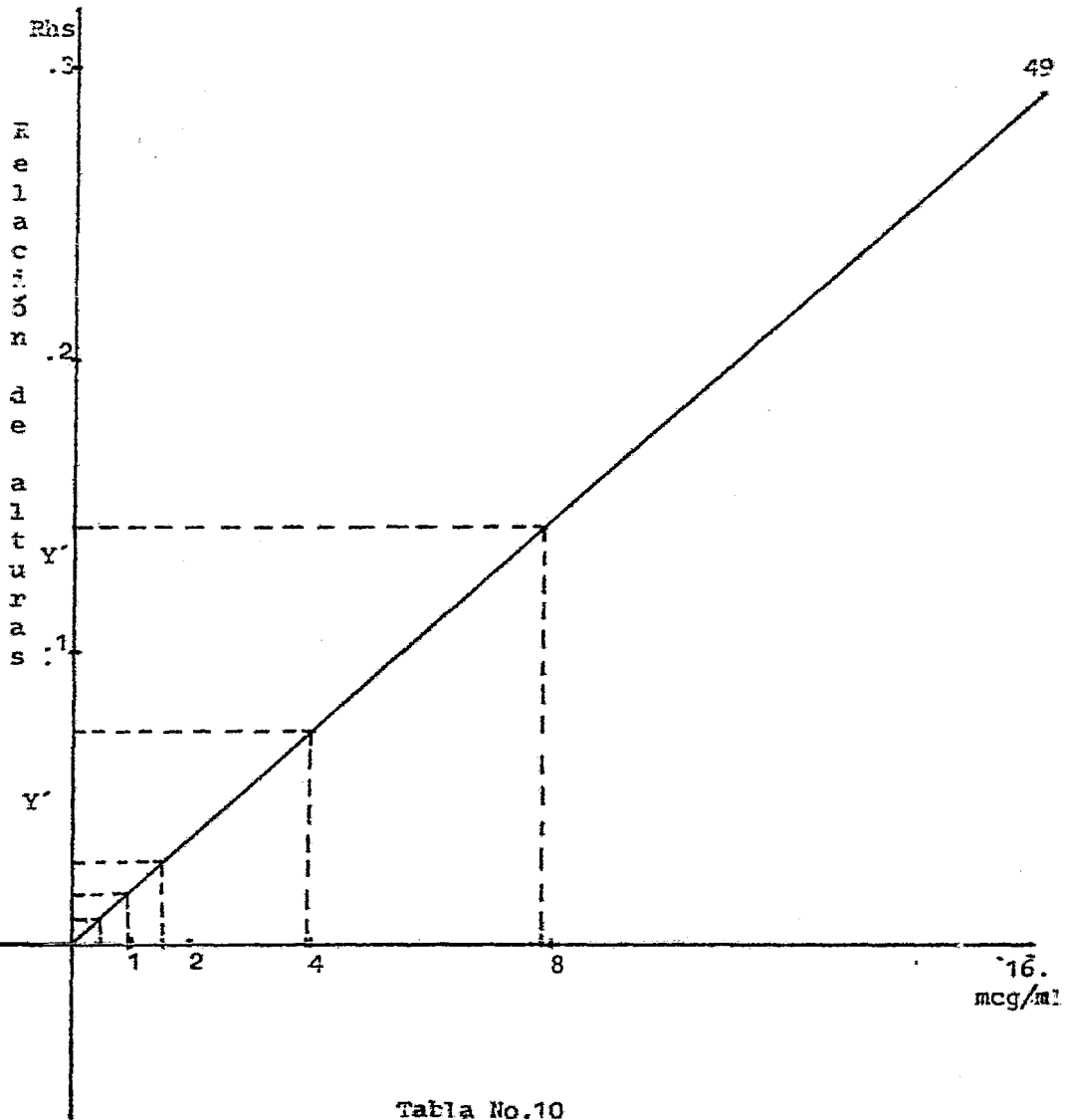


Tabla No.10

Determinación de la Concentración Real de Griseofulvina en orina por la interpolación en la curva de Referencia No.3

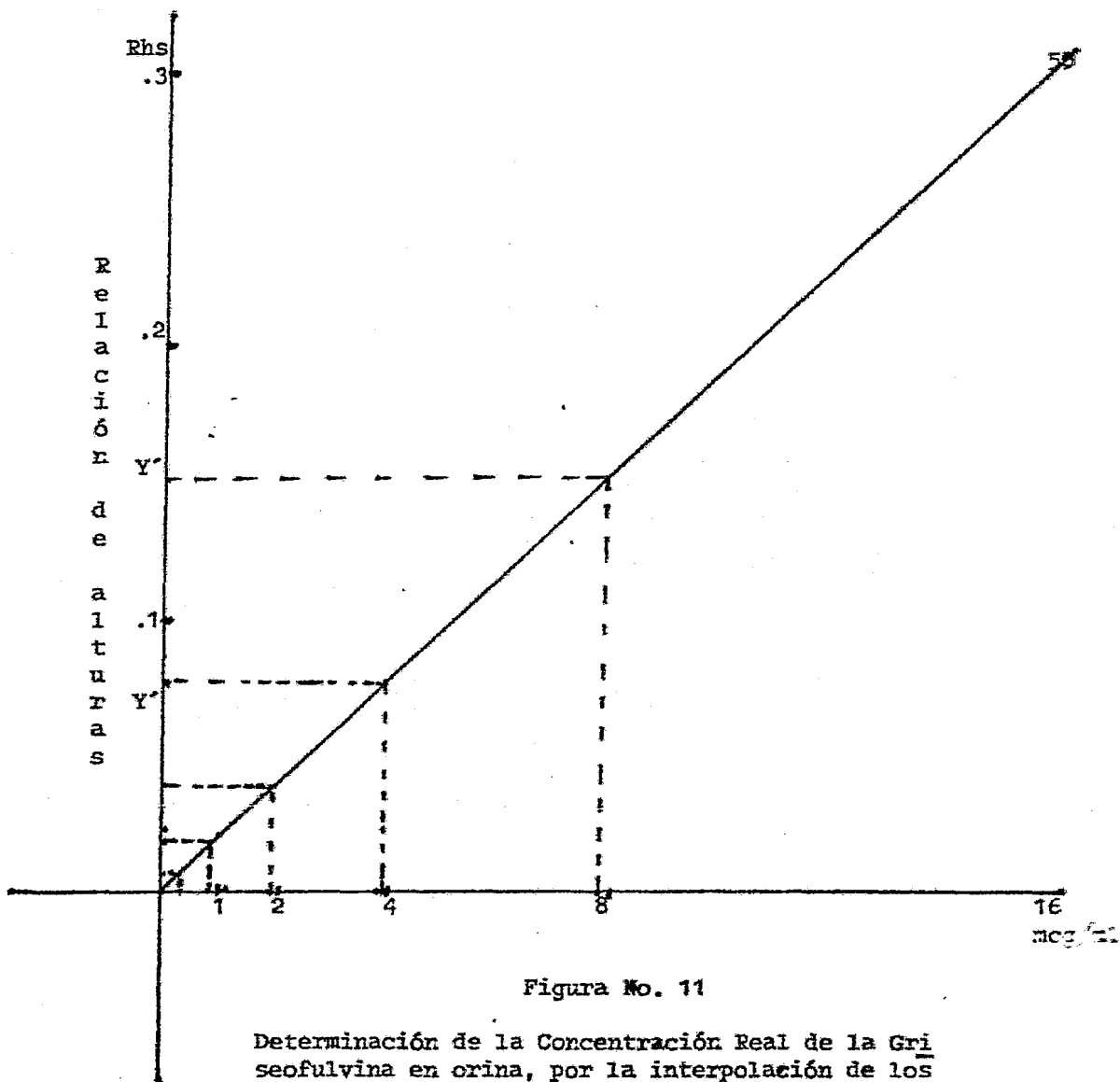


Figura No. 11

Determinación de la Concentración Real de la Gri seofulvina en orina, por la interpolación de los datos de la tabla No. 4 en la curva de referencia.

#### IV.1.3. Coeficiente de Variación en la Extracción.

En la tabla No.10 se presentan los datos obtenidos en la -  
determinación del Coeficiente de Variación en la Extracción que  
se describe en la sección III.1.7

Tabla No. 10

Coeficiente de Variación en la Extracción, para una con-  
centración de 2 mcg/ml.

<u>Determinación No.</u>	<u>Relación de alturas.</u>
1.-	0.0182
2.-	0.0170
3.-	0.0169
4.-	0.0191

$$\text{Coeficiente de Variación } \frac{(\sigma_n)_x}{\bar{x}} \cdot 100$$

$$\bar{x} = 0.01779 \quad ; \quad \sigma_n = 0.000887$$

$$\text{C.V.} = 4.986\%$$

IV.1.4. Estabilidad: Los resultados obtenidos al realizar la — prueba de estabilidad de Griseofulvina en orina como se explicó en la sección III.1.6 se presentan en la tabla No. 11, donde se puede observar que la Griseofulvina no sufre degradación en un período de cuatro semanas.

Tabla No. 11

Estabilidad de Griseofulvina en orina en un período de cuatro semanas.

Muestra No.	Tiempo en semanas.			
	0	2a.	3a.	4a.
1.-	0.0368	0.0349	0.0365	0.0310
2.-	0.0349	0.0296	0.0320	0.0278
3.-	0.0325	0.0333	0.0339	0.0286
4.-	0.0338	0.0394	0.0326	0.0384
5.-	0.0328	0.0305	0.0306	0.0293

#### IV.2. DETERMINACIÓN DE GRISEOFULVINA EN PLASMA UTILIZANDO DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES.

En la figura No.12 se representa el Cromatograma obtenido al realizar la cuantificación de Griseofulvina en plasma, utilizando detector de captura de electrones. Se puede observar los tiempos de retención para el estandar interno y la Griseofulvina que son de 3.5 y 7.5 minutos respectivamente.

Con el fin de cuantificar la Griseofulvina en plasma se realizaron 8 determinaciones, las cuales corresponden a las curvas No. 5-12.

Las tablas No. 12 y 13 presentan los resultados obtenidos en estos experimentos; en ellas aparecen las relaciones de altura de los picos para cada concentración. En las determinaciones hechas en plasma con el detector de captura de electrones, las concentraciones que se determinaron fueron en el rango de 15.6 a 1000 ng/ml.

IV.2.1. Linealidad. Los datos de las tablas No.12 y 13 aparecen gráficamente en la figura No.13 donde se puede observar la linealidad que presentan las curvas en las ocho determinaciones.

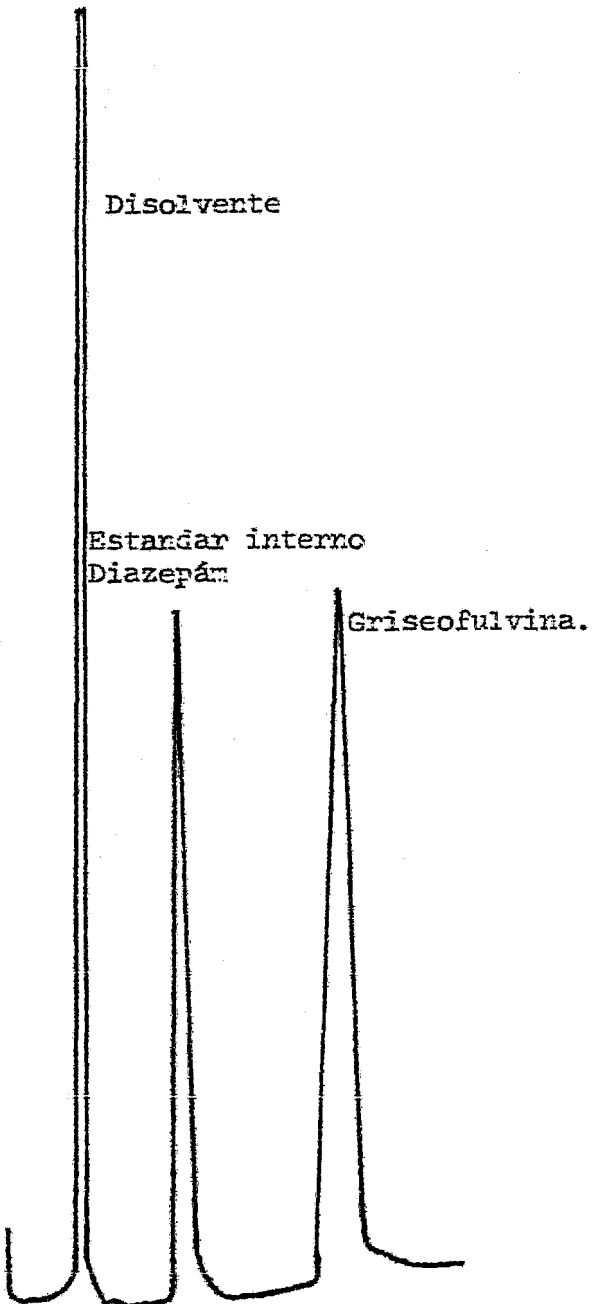


Figura No. 12

Cromatograma de Griseofulvina en plasma utilizando detector de captura de electrones.  
Concentración de Griseofulvina = 125 ng/ml.  
Ateruación: 128x  
Rango: 10

Tabla No. 12

Determinación de Griseofulvina en Plasma utilizando detector de captura de Electrones. ( Concentración Vs. Relación de alturas).

Concentración ng/ml	Determinación No.			
	5	6	7	8
	Altura del Problema/ altura del Estandar Int.			
15.6	0.0891	0.1435	0.1571	0.1423
31.25	0.1112	0.1887	0.1340	0.1481
62.5	0.1489	0.2080	0.1818	0.2008
125.0	0.2167	0.2991	0.3091	0.4638
250.0	0.3485	0.4709	0.3592	0.4638
500.0	.	0.7120	0.6313	0.8431
1000.0		0.5871	1.333	1.7197

Tabla No.13

Determinación de Griseofulvina en plasma utilizando detector de captura de electrones. (Concentración Vs. Relación de alturas.)

Concentración ng/ml	Determinación No.			
	9 Altura del Problema/	10 Altura del Problema/	11 Altura del Problema/	12 Altura del Estandar Interno.
15.6	0.1392	0.1639	0.2051	0.1864
31.25	0.1670	0.1887	0.1886	0.2096
62.5	0.2125	0.2032	0.2132	0.2042
125.0	0.2781	0.2418	0.3181	0.3236
250.0	0.4106	0.4001	0.4107	0.4375
500.0	0.6849	0.6825	0.7042	0.6497
1000.0	1.1534	1.1173	1.1500	1.0887



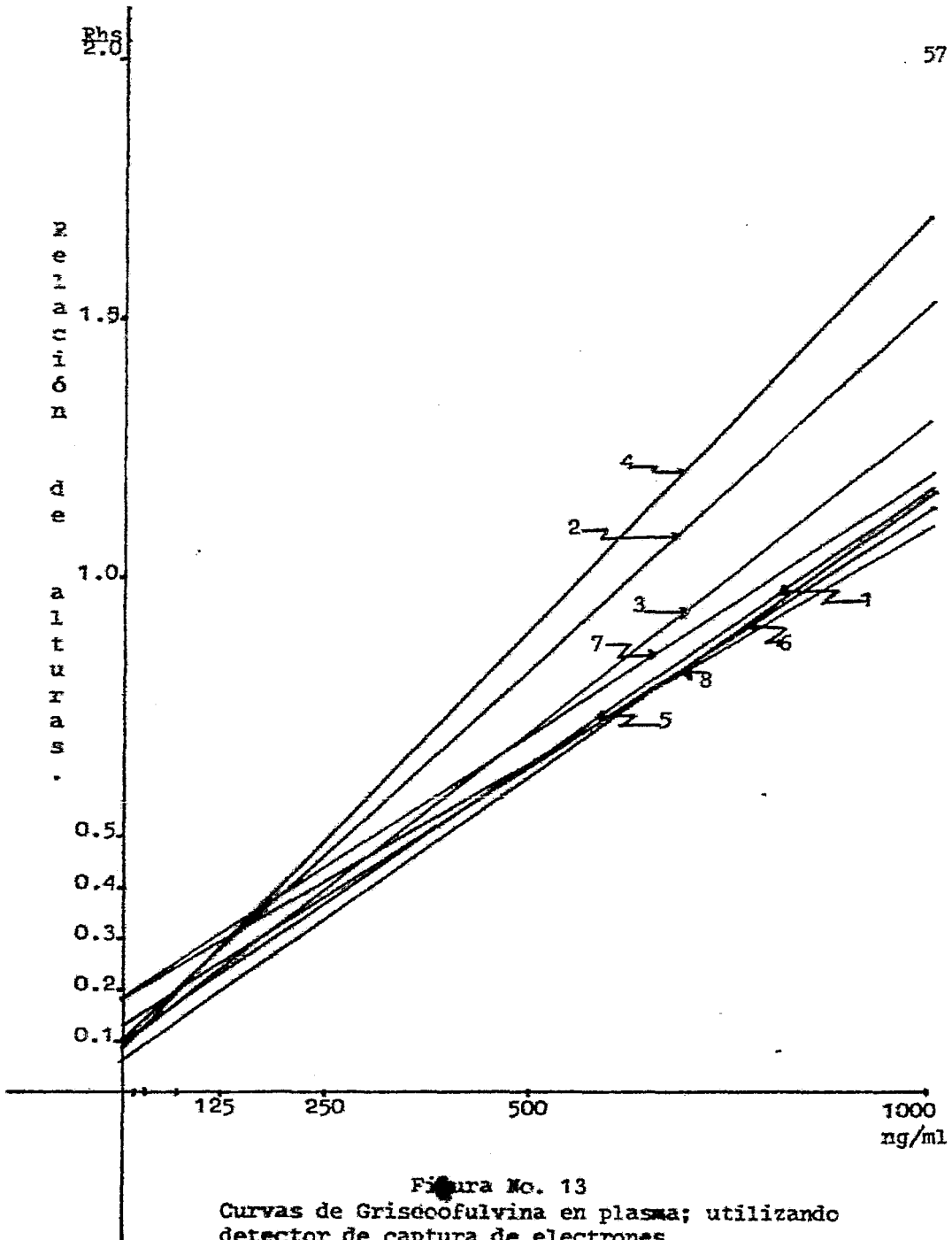


Figura No. 13

Curvas de Grisecofulvina en plasma; utilizando detector de captura de electrones.  
 Datos correspondientes a las tablas No. 12 y 13

En la tabla No. 14 se presentan los resultados de Interceptos, Pendientes y Coeficientes de Correlación de las determinaciones realizadas para cuantificar Griseofulvina en plasma usando detector de captura de electrones.

Tabla No.14

Resultados de Interceptos, Pendientes y Coeficientes de Correlación en la determinación de Griseofulvina en plasma, utilizando detector de captura de electrones.

Experimento No.	Intercepto	Pendiente $1 \times 10^{-3}$	Coeficiente de Correlación.
5	0.077	1.095	0.999
6	0.112	1.423	0.995
7	0.107	1.186	0.994
8	0.095	1.595	0.999
9	0.144	1.025	0.999
10	0.152	0.980	0.998
11	0.175	0.989	0.998
12	0.183	0.917	0.998

#### IV.2.2. Coeficiente de Variación en la Extracción.

En la tabla No. 15 se presentan los datos obtenidos en la determinación del Coeficiente de Variación en la Extracción que se describe en la sección III.2.6.

Tabla No. 15

Coeficiente de Variación en la Extracción en la determinación de Griseofulvina en plasma; para una concentración de 125 ng/ml.

<u>Determinación N.º.</u>	<u>Relación de alturas.</u>
1.-	0.314
2.-	0.357
3.-	0.395
4.-	0.361
5.-	0.367
6.-	0.371
7.-	0.368

Coeficiente de Variación:  $\frac{\sigma_n}{\bar{x}} (100)$

$$\bar{x} = 0.365 \quad ; \quad \sigma_n = 0.0243$$

C.V. = 6.65%

IV.2.2.Coeficiente de Variación en la Extracción.

En la tabla No. 15 se presentan los datos obtenidos en la determinación del Coeficiente de Variación en la Extracción que se describe en la sección III.2.6.

Tabla No. 15

Coeficiente de Variación en la Extracción en la determinación de Griseofulvina en plasma; para una concentración de 125 ng/ml.

Determinación N <sup>o</sup> .	Relación de alturas.
1.-	0.314
2.-	0.357
3.-	0.395
4.-	0.361
5.-	0.367
6.-	0.371
7.-	0.388

Coeficiente de Variación:  $\frac{\sigma_n (100)}{\bar{X}}$

$\bar{X} = 0.365$  ;  $\sigma_n = 0.0243$

C.V. = 6.65%

#### IV.2.3. Estabilidad.

En la sección III.2.7. se describe la prueba de estabilidad realizada en plasma en un periodo de cuatro semanas. Los resultados obtenidos de esta prueba se presentan en la tabla No. 16, donde se puede observar que la Griseofulvina no sufre degradación en este periodo.

Tabla No. 16

Estabilidad de Griseofulvina en plasma en un periodo de cuatro semanas.

Muestra No.	Tiempo en semanas.			
	0	2a.	3a.	4a.
1.-	---	0.334	0.320	0.276
2.-	0.394	0.381	0.339	0.310
3.-	0.305	0.341	---	0.278
4.-	0.365	0.405	0.327	0.306
$\bar{x}$	0.355	0.366	0.329	0.293

7.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

V.1. Determinación de Griseofulvina en Orina utilizando detector de ionización de llama.

a).- Sensibilidad: Es la relación a una concentración dada del incremento en la respuesta ( $\Delta R$ ) y el correspondiente incremento en la concentración ( $\Delta C$ )

$$S = \left( \frac{\Delta R}{\Delta C} \right) C$$

Las unidades de sensibilidad dependen de las unidades en la cual  $\Delta R$  y  $\Delta C$  se expresen; por lo tanto la sensibilidad de dos diferentes métodos analíticos no pueden ser comparados al menos que  $\Delta R$  y  $\Delta C$  sean expresados en las mismas unidades.

En este caso podemos comparar la sensibilidad del detector de ionización de llama, con la del detector de captura de electrones de acuerdo a los resultados obtenidos prácticamente.

En este caso  $\frac{\Delta R}{\Delta C}$  es igual a la pendiente = m

$$S_{i-ll} = \frac{\Delta R}{\Delta C} = m ; m = 0.0187 \text{ ml/mcg.}$$

$$S_{c.e.} = \frac{\Delta R}{\Delta C} = m ; m = 2.3025 \times 10^{-3} \text{ ml/ng.}$$

$$2.3025 \times 10^{-3} \text{ ml/ng} \times 1000 \text{ ng/1 mcg} = 2.3025 \text{ ml/mcg.}$$

$$S_{c.e.} = 2.3025 \text{ ml/mcg}$$

$$S_{i-ll} = 0.0187 \text{ ml/mcg.}$$

Observamos de acuerdo a estos resultados, que el detector de captura de electrones es del orden de 100 veces más sensible que el detector de ionización de llama.

b).- Cantidad mínima detectable: Médiante el método de icnización de llama se lograron detectar concentraciones de 0.5 mcg/ml.

c).- Linealidad: Como se puede observar en las figuras 6 y 7 las curvas presentan linealidad en el rango de 0.5 - 16 mcg/ml.

Para demostrar que no hay diferencias significativas entre las curvas tanto de los problemas como de las curvas de referencia se realizó un análisis estadístico de pendientes en las determinaciones de Griseofulvina en orina.

En la tabla No. 17 se presentan los datos del análisis estadístico de covarianza para las pendientes de las curvas de orina.

Tabla No. 17

Datos de la Covarianza para el análisis de pendientes de los experimentos 1,2,3, y 4 en la determinación de Griseofulvina en orina.

	SSg	gl	MSg	YR <sup>-2</sup>
Debido a pendientes	$5.6 \times 10^{-6}$	1	$5.6 \times 10^{-6}$	$1.418 \times 10^{-3}$
Distribución entre pendientes.	$1.0 \times 10^{-7}$	3	$3.0 \times 10^{-8}$	$7.693 \times 10^{-6}$
Residual	0.023944	16	$3.899 \times 10^{-3}$	
Dentro de los grupos	0.0624	20.		



$$F(.95)_{1,16} = 4.44$$

$$F(.95)_{3,16} = 3.24$$

$P > 0.005$

Lo cual demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las curvas.

d).- Coefficiente de Correlación: Como se puede observar en la tabla No. 5 el Coeficiente de Correlación para las curvas de referencia como para las curvas problema en el rango de concentración de 0.5- 16 mcg/ml es de 0.9994

e).- Coefficiente de Variación: Para una concentración media en la curva (2 mcg/ml), el método presenta un Coeficiente de Variación de 4.98%.

f).- Estabilidad: Se observó que no hay cambios significativos en la concentración de Griseofulvina en orina almacenada en congelación en un período de cuatro semanas. Los resultados se analizaron estadísticamente encontrándose que no existen diferencias significativas. Los resultados de esta prueba se presentan en la tabla No. 18.

Tabla No. 18

Datos del análisis estadístico para la prueba de estabilidad de la Griseofulvina en orina.

	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado medio.
Entre categorías	0.00004	3	$1.333 \times 10^{-5}$
Dentro de los grupos	0.0001673	16	$1.045 \times 10^{-5}$
Total	$2.073 \times 10^{-4}$		

Razón F = 1.2788

F(.95) = 3.24

P > 0.005

g.-Especificidad: Esta prueba no se realizó ya que para ello se necesita sintetizar los metabolitos. Sin embargo reportes bibliográficos (14) indican que no hay interferencia con los tiempos de retención de la Griseofulvina, ya que los metabolitos tienen un tiempo de retención menor que el de la Griseofulvina.

#### V.2. Determinación de Griseofulvina en plasma utilizando detector de captura de electrones.

a).-Cantidad Mínima Detectable: La determinación de la Griseofulvina en plasma requiere un método más sensible que el utilizado para orina ya que las concentraciones encontradas en sangre son mucho más pequeñas que las encontradas en orina; por esta razón se utilizó el detector de captura de electrones; que es más sensible y detecta sin dificultad concentraciones en el rango de -

de nanogramos.

b).-Linealidad: Utilizando el detector de captura de electrones se puede observar en la figura No.13 que el método presenta linealidad en el rango de 15.6-1000 ng/ml el cual es el rango de concentración que normalmente se encuentra en sangre ( 14,10).

c).-Coeficiente de Correlación: De acuerdo a las curvas de la - figura No.13 observamos que hay linealidad en todas ellas; manteniendo un Coeficiente de Correlación promedio de 0.997

Los resultados obtenidos en la determinación de Griseofulvina en plasma se analizaron de acuerdo a un análisis estadístico para observar si las diferencias en la correlación de los puntos era significativa. Para ello se efectuó el análisis estadístico de acuerdo al modelo de dos variables de Clasificación única; en donde contrasta filas y columnas. Con este diseño se pretende de mostrar que de acuerdo a los datos analizándolos por filas deberán presentar una diferencia significativa, ya que corresponden a concentraciones diferentes; por otro lado, analizándolas de acuerdo a las columnas no deberán presentar diferencias significativas ya que son los puntos con los que se trazaron las curvas y éstos presentan pendientes semejantes.

En la tabla No. 19 se presentan los resultados de los cálculos efectuados para esta prueba, en la cual se demuestra que entre filas si hay diferencias, mientras que para las columnas no la hay.

Tabla No. 19

Análisis estadístico para Coeficiente de Correlación en la determinación de Griseofulvina en plasma. Modelo de dos variables de clasificación única para el contraste entre filas y entre las columnas.

	Suma de Cuadrados.	gl	Cuadrado me dio.	Razon F
Entre filas.	8.1916	6	1.365	<u>1.365</u> 0.000827
Medias de columnas.	0.1269	7	0.01812	<u>0.01812</u> 0.000827
Residual	0.3475	42	0.00827	
Total	8.666			

La razón F: = 165.05 ( filas).  
2.191( columnas).  
(f.95) de tablas para columnas =2.25; para filas =2.34

Así mismo se realizó un análisis estadístico de covarianza con el fin de determinar si había diferencias entre pendientes de las curvas de la figura No.13. Este análisis al igual que un análisis de varianza también nos conduce a un contraste para la diferencia entre medias; mediante la división en varios sumandos de una suma de cuadrados.

En base a las tablas No. 12 y 13 se realizaron los cálculos de la prueba de Covarianza que se presentan a continuación.

$$T_{x++} = 14374.9$$

$$T_{y++} = 23.7999$$

$$nk = 36$$

Suma total de productos:

$$\sum \sum X_{ij} Y_{ij} \frac{-T_{x++} T_{y++}}{nk} = 6541.239$$

Suma de productos dentro de los grupos:

$$\sum \sum X_{ij} Y_{ij} \frac{-T_{x+} T_{y+}}{n} = 6300.81$$

Suma de productos entre medias:

$$\frac{T_{x+} T_{y+}}{n} - \frac{-T_{x++} T_{y++}}{nk} = 240.42$$

$$T^2 = Y^2 - \frac{(\sum XY)^2}{X}$$

Tabla No. 20

Análisis de covarianza para observar diferencias entre pendientes de las curvas en la determinación de Griseo-fulvina en plasma.

	gl	X <sup>2</sup>	XY	Y <sup>2</sup>	gl	Y <sup>2</sup>	Cuadrado m.
Entre medias	7	157992.15	240.42	0.4539	7	0.01058	001512
Dentro de los grupos.	46	5431445.5	6300.81	7.6581	45	0.34877	000775
Tótal	53	5589437.6	6541.23	8.112	52	0.4546	

$$F(.95) = 2.25$$

$$F = \frac{0.01512}{0.00775} = 1.9505$$

$$F > 0.05$$

En donde se demuestra que no hay diferencias.

VI.-CONCLUSIONES.

El método de Cromatografía de Gas-Líquido utilizando el detector de ionización de llama para determinar Griseofulvina en orina posee una reproducibilidad adecuada; demostrándose mediante un análisis de covarianza de las pendientes e interceptos, en el cual se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas.

En la determinación en orina el intervalo de concentración en el cual la Griseofulvina presenta linealidad se encuentra entre 0.5- 16 mcg/ml, con un Coeficiente de Correlación promedio de 0.9994.

El porcentaje de recuperación de Griseofulvina en la extracción en orina en este rango de concentración es de 95.8%, obteniéndose un Coeficiente de Variación a una concentración media de 4.98%.

La prueba de estabilidad nos indica que las muestras que contienen Griseofulvina disuelta en orina puede permanecer en congelación un mes sin que sufran degradación.

El método de Cromatografía de Gas-Líquido utilizando detector de captura de electrones para la cuantificación de Griseofulvina en plasma puede detectar hasta 15 ng/ml. El rango de linealidad en este método se encuentra entre 15- 1000 ng/ml con un Coeficiente de Correlación promedio de 0.997.

El Coeficiente de Variación obtenido en la extracción de Griseofulvina en plasma es de 6.68%.

La prueba de estabilidad de Griseofulvina disuelta en plasma demuestra que puede permanecer un mes en congelación sin que sufra degradación.



La sensibilidad en el método, utilizando detector de captura de electrones es del orden de 100 veces mayor que el detector de ionización de llama.

El tiempo de análisis es relativamente corto; tomando en cuenta que solamente se hace una extracción en cada muestra y el tiempo de inyección mínimo es de 10 minutos.

Los reactivos utilizados tanto para la determinación en sangre como en orina son del uso común, fácil adquisición y económicos.

En base a las características de sensibilidad, reproducibilidad, linealidad y cantidad mínima detectable el método de Cromatografía de Gas- Líquido para la determinación de Griseofulvina tanto en plasma como en orina, resulta adecuado para ser utilizado en estudios de biodisponibilidad.

VII :- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- The Index Merck, An Encyclopedia of Chemical and Drugs, nine Edition, Merck and Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.S.A., 1976
- 2.- United States Pharmacopeia XIX (1975)
- 3.- P.H. Elworthy, F.J. Lepscomb. "A note on the solubility of Griseofulvin" *J. Pharm. Pharmacol* 20, 790 (1968)
- 4.- Chávez Porras, Ma. G.; "Estudios de la Disolución de Griseofulvina in Vitro" Tesis para título de Q.F.B. Fac. de Química., U.N.A.M., México, D.F. (1977).
- 5.- Chiou, W.L. y Riegelman.; "Preparations and dissolution characteristic of several fast release solid dispersions of Griseofulvin" *J. Pharm. Sci.* 58, 1505 (1969).
- 6.- A. Brossi, M. Bauman, M. Gereche and E. Kybeirz. "Synthesis experiments in the Griseofulvin series: Total synthesis of Griseofulvin" *Helv. Chem. Acta* 43, 1444 (1960).
- 7.- A.C. Day, J. Nabney and A.I. Scott. "The total synthesis of - Griseofulvin" *Proc. Chem. Soc.* 284 (1960).
- 8.- C.H. Kuo, R. D. Hoffsomner, H.L. Slates, D. Taub and N.L. - Wendler; *Chem and Ind* 1627 (1961).
- 9.- G. Stork y M. Tomas.; "A new synthesis of ciclohexanonas. Applications to the total synthesis of dl-Griseofulvin" *J. Am. Soc.* 86, 47 (1964).
- 10.- Lin. J. Magat, R. Chang, Mc Glotten y S. Symchowecz.; "Absorption, metabolism and excretion of 14-C-Griseofulvin in man." *J. Pharmacol and Exp. Ther.* 187, 415 (1973).
- 11.- C. Bedford, K.J. Child y E.G. Tomich.; "Spectrophotofluorometric assay of Griseofulvina" *Nature* 195, 364 (1959).

- 12.- M. Krame, J. Dubuc y D. Dvornik; "Modification of the spectrofluorometric determination of Griseofulvin" *J. Pharm. - Sci.* 54, 655 (1965).
- 13.- M. Rowland, S. Riegelman y L. Epstein; "Absorption Kinetics of Griseofulvin in man" *J. Pharm Sci.* 57, 984 (1968).
- 14.- V.P. Shah, S. Riegelman y W.L. Epstein; "Determinations of Griseofulvin in skin, plasma and sweat". *J. Pharm. Sci.* 61, 634 (1972).
- 15.- M. Rowland y S. Riegelman; "Determination of 6-dimethylgriseofulvin in urine"; *J. Pharm. Sci.* 62, 2030 (1973).
- 16.- M. Mrtk. L.J. Lebeau R.G. Mrtk; "Microculture assay for the rapid determination of antifungal activity" *J. Pharm. Sci.* 58, 1362 (1960)
- 17.- S. Iguchi. M. Yamamoto y T. Goromaru; "quantitative determination of Griseofulvin by Gas-Liquid Chromatography" *J. Chromatog.* 24, 182 (1966).
- 19.- M. Margosis; G.L.C. Analysis of Grisofulvina. A Collaborative study" *J. Pharm.-Sci.* 64, 1020 (1975).
- 18.- M. Margosis; " Analysis of antibiotics by Gas Chromatography III Griseofulvin" *J. Chromatograph.* 70, 73 (1972).
- 20.- H.J. Schwars. B.A. Waldman y V. Madrid; "G.L.C. determination of Griseofulvin in human plasma" *J. Pharm Sci.* 65, 370 (1976).
- 21.- A.E. Oxford, H. Raistrick y P. Simonart; "Studies of Biochemistry of microorganisms LX Griseofulvin, metabolic product of *Penicillium Griseofulvum*" *Biochem.J.* 33, 240 (1939).
- 22.- Kn. W. Wmmona, H. Binford y J. P. Utz.; "Medical Micology - 3th Edition. Ed. The Williams and Welkins Co. Baltimore 1969.

- 23.- El Nakeeb, M.A. Mc. Lillan. W.L. y Dampen, J.C.; "Antibiotic action of Griseofulvin on dermatophytes" *J.Bacterial* 89, 557 (1965).
- 24.- Bevrey, J.; "Griseofulvin as a fungistic and inflammatory agent" *Ann. Med. Nancy* 2, 478-93 (1963).
- 25.- J.A. Drill; "Farmacología Médica" *Prensa Médica Mexicana* 1969.
- 26.- D.W. Anderson; "Griseofulvin Biology and clinical use fulnes" *Annals of Allergy* 23, 103 (1965).
- 27.- M.F. Huber y D. Gottlieb; "The mechanisms of action of Griseofulvin" *Canad J. Microbiol.* 14, 111 (1968).
- 28.- T.H. Sternberg, V.S. Newcomer y R.M. Reiser; "Current status of Griseofulvin and Amphoteracin" *B. Med. Clin. N. Amer* 45, 781 (1961).
- 29.- L. Zeprowaki, A. Krakowaki y Schewach Millet; "Dermatitis medicamentosa due to Griseofulvin" *Bull. Hyg.* 36, 547 (1961).
- 30.- T.W. Chang; "Cold urticaria and Photosensitivity due to Griseofulvin", *J.Amer. Med. Ass.* 193, 848 (1965).
- 31.- S. Goldblatt; "Severe reaction to Griseofulvin. Sensitivity investigation" *Arch. Derm.* 83, 936 (1961).
- 32.- J. Alban; "Griseofulvin Therapy in tinea capitis" *J.Pediat* 58, 367 (1961).
- 33.- H. Blank, J.G. Smith, F.J. Roth y N Zaias; "Griseofulvin for the systemic treatment of dermatomycosis." *J.Amer. Med. Assoc.* 171, 2168 (1959).
- 34.- Moss y Mc. Quown; "Atlas of Medical Micrology". 5th Edition. Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore 1969.
- 35.- Agelberg; "Manual de Microbiología Médica. Sexta Edición Ed. El Manual Moderno (1975).

- 36.- S.L. Whitby y E. Heward. "Medical Bacteriology" 7a. Ed. by Martin Hynes y A. Churchill. London (1961).
- 37.- Goodman and Gilman; "Bas a Farmacológicas de la Terapéutica 5 Ed. Interamericana 1975.
- 38.- Davis, B. Child, K.J. , and Tomich, E.G. J. Pharm. Pharmacol. 13, 166 (1961).
- 39.- Y. Garceaa , J. Brisson, I. Davis, R.L. De Angelis and J. - Hasegawa; "T.L.C. determination of Griseofulvin in-plasma - and 6-desmethylgriseofulvin in urine" J.Pharm. Scie. 69, 561 (1980).
- 40.- Dixon y Massey; "Introducción al análisis estadístico" 2a. - Edición Ed. Mc. Graw Hill, México 1970).