



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA.**

44.

"OPTIMIZACION Y VALIDACION DE UN METODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACION DE SULFAMETOXAZOL EN MICROMUESTRAS DE SANGRE DE RATA"

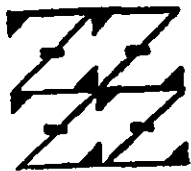
291426

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO (FARMACIA)  
P R E S E N T A**

**HORTENSIA ELENA MARTINEZ PERALTA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**ASESOR : LETICIA CRUZ ANTONIO**



**LO HUMANO  
ES  
DE NUESTRA REFLEXION**

**MÉXICO D.F. 2001**



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.

## AGRADECIMIENTOS

### A SU SUPERVISORA

Por su comprensión y apoyo en todo momento, por la ayuda que siempre me brindo, aún en los momentos más difíciles, no tengo otra palabra que decirle sino mil gracias.

### A MIS HERMANOS

María, Carlos, Olga,  
Oscar y Violeta sin  
cuyo apoyo no hubiera  
logrado este objetivo.

### A MI ASESORA

Leticia Cruz Antonio por  
su paciencia y apoyo para  
la realización de esta tesis.

EN VERDAD LES DIGO QUE:

*“NO IMPORTA CUANTO TE TARDES EN CONSEGUIR ALGO YA QUE  
LO IMPORTANTE ES PERSISTIR HASTA EL ULTIMO MOMENTO Y  
LOGRARLO, PORQUE BIEN SE DICE QUE NO HAY NADA MEJOR  
QUE DISFRUTAR Y SABOREAR EL TRIUNFO DE LLEGAR A UNA  
META MUY DESEADA”*

# TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
FUNDAMENTACION TEORICA.....	3
1. Validación.....	3
1.1 Diferentes métodos analíticos para cuantificar sustancias en fluidos biológicos.....	4
1.2 Principios para establecer la validación del método en fluidos biológicos.....	8
1.3 Definición de algunos parámetros analíticos.....	10
2. Sulfonamidas.....	12
2.1 Absorción, destino y eliminación de las sulfonamidas.....	14
3. Monografía del sulfametoxazol.....	16
4. Espectrofotometría.....	18
4.1 Ley de Beer.....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
OBJETIVOS.....	25
General.....	25
Específicos.....	25
HIPOTESIS.....	26
MATERIAL.....	27
Reactivos.....	29
Equipo.....	31
Material biológico.....	31
Diagrama general de la metodología.....	32
METODOLOGIA.....	33
1. Análisis del sulfametoxazol (materia prima).....	33
2. Diagrama de la técnica analítica general para cuantificar sulfonamidas en sangre.....	35
3. Diagrama de la técnica analítica optimizada para cuantificar sulfametoxazol en muestras de sangre.....	36
4. Validación del método.....	37

4.1Especificidad.....	37
4.2Estabilidad de la muestra.....	38
4.3Concentración-respuesta.....	39
4.4EXACTITUD Y PRECISION.....	40
4.4.1Exactitud y precisión intradía.....	40
4.4.2Exactitud y precisión interdías.....	41
5.Aplicación del método analítico propuesto.....	42
RESULTADOS.....	43
1.Análisis del sulfametoxazol (materia prima).....	43
2.Especificidad.....	44
3.Estabilidad.....	45
4.Concentración-respuesta.....	48
5.Precisión y exactitud intradía.....	50
6.Precisión y exactitud interdías.....	51
7.Perfil de concentración plasmática vs tiempo.....	52
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	54
CONCLUSIONES.....	58
SUGERENCIAS.....	59
ANEXOS.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	64

# INTRODUCCION

La realización de estudios de Biodisponibilidad y Farmacocinética han ido aumentando de una manera notable en nuestro país, no solamente por el hecho de cumplir una normatividad para asegurar la intercambiabilidad de los medicamentos, sino también para determinar el reconocimiento puro de las velocidades de movimiento de los medicamentos o sus metabolitos dentro del organismo, obteniéndose así información muy valiosa acerca de la liberación, absorción, distribución, biotransformación y eliminación del medicamento, pudiéndose de esta manera sacar conclusiones para una mejor utilización del mismo.

Para la correcta realización de estos estudios y la confiabilidad en la información arrojada por los mismos, se necesita que las técnicas analíticas utilizadas para la cuantificación de las sustancias y/o sus metabolitos estén correctamente validadas; en especial en las técnicas que son utilizadas para cuantificar sustancias en fluidos biológicos, en donde debido a las características particulares de las muestras estudiadas pueden variar los resultados obtenidos en cada medición, por lo tanto la validación viene a ser una parte muy importante para tener bajo control y de una manera documentada que todas las variables que afectan la técnica está controladas

y así garantizar que la información obtenida es confiable en los estudios de Farmacocinética y Biodisponibilidad realizados.

La validación de un método analítico con aplicación a estudios de Biodisponibilidad implica todo un análisis por medio del cual se determina la especificidad, estabilidad, concentración-respuesta, exactitud y precisión del método, implicando al mismo tiempo un análisis estadístico con el fin de garantizar que la validación estuvo correctamente realizada. En el presente trabajo se utilizó una técnica colorimétrica para determinar sulfametoxazol libre en micromuestras sanguíneas de rata, en donde el grupo aril amino del sulfametoxazol fue diazoado con ácido nitroso y posteriormente copulado con N-1(naftil)-etilendiamino hidrociorado produciéndose un color rojo púrpura que fue leído a 545 nm. Por medio de esta técnica se determinaron la especificidad, estabilidad, concentración-respuesta, exactitud y precisión del método, y a través de los cálculos estadísticos establecidos se obtuvo la información necesaria para determinar que estos parámetros entraban dentro de las especificaciones requeridas.



# **FUNDAMENTACION TEORICA**

## **1. VALIDACION**

La validación de métodos analíticos es aquella actividad debidamente documentada la cual provee un alto grado de garantía de que un método analítico produce consistentemente resultados realizados en diferentes condiciones. <sup>(1,2,3)</sup> El término actividad debe de interpretarse por el desarrollo de estudios, ya sea por revisión de casos (validación retrospectiva) o por experimentación (validación prospectiva). Estos estudios deben de estar documentados mediante protocolos, en los que se informe el procedimiento de obtención de la información, así como de reportes, en los cuales se describa el análisis de ésta y se concluya respecto del estudio en cuestión. Estos estudios permitirán establecer el status de confiabilidad, enfocados a la evaluación de ciertos parámetros analíticos reconocidos tanto a nivel nacional como internacional (exactitud, precisión, tolerancia, etc). El propósito del método analítico debe ser establecido con claridad, ya que en función del propósito se establecen los estudios a desarrollar para cada parámetro. <sup>(4,5,6,7)</sup>

Por otro lado los métodos analíticos son utilizados para la determinación cuantitativa de fármacos o sus metabolitos en muestras biológicas, juegan un papel importante en la evaluación e interpretación de datos de Biodisponibilidad, Bioequivalencia o Farmacocinética. Es importante el recalcar que cada técnica analítica tiene sus propias

características que varían de un fármaco a otro, además la conveniencia de una determinada técnica esta influenciada por el objetivo perseguido en el estudio.

La validación de métodos analíticos incluye la aplicación de todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método particular empleado para la determinación cuantitativa de la concentración de una sustancia de interés (o series de sustancias de interés) en una matriz biológica particular es segura y confiable en su utilización. Se le llama matriz biológica a un material único de origen biológico que puede ser manipulado de modo reproducible. <sup>(8)</sup>

## **1.1 Diferentes métodos analíticos para la cuantificación de sustancias en fluidos biológicos**

Un aspecto muy importante que ha contribuido a establecer un criterio correcto respecto a los estudios de biodisponibilidad y farmacocinética es el desarrollo de las técnicas analíticas de cuantificación de fármacos en fluidos o en muestras biológicas.

Las técnicas para cuantificar fármacos o sus productos de biotransformación en muestras biológicas, se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- 1. Métodos biológicos:** procedimientos basados en inmunoensayos y análisis microbiológicos (p. ej. de antibióticos).
- 2. Métodos físico-químicos:** cromatografía, espectrofotometría, entre otros.

## 1. Métodos biológicos

Las técnicas de inmunoensayo están basadas en la capacidad de un fármaco dado para inhibir la reacción entre los anticuerpos específicos para ese fármaco y un fármaco marcado. En otras palabras, se presenta competencia entre fármaco marcado y sin marcar (antígeno), por el anticuerpo específico para dicho principio activo. Las técnicas más conocidas basadas en inmunoensayo son: radioinmunoensayo, inmunoensayo multienzima, ensayo inmunoabsorbente por unión a enzimas (RIA, EMIT, ELISA).

Entre las ventajas de los métodos biológicos se pueden mencionar:

- 1) Alta sensibilidad. En algunos casos, se pueden cuantificar concentraciones del orden de picogramos ( $10^{-12}$  g/ml).
- 2) Pequeño volumen de muestra. Generalmente se trabaja con muestras del orden de 100  $\mu$ l.
- 3) Rapidez de análisis. En este tipo de análisis no se requiere de largos procesos de extracción de la sustancia de interés, a través de un lavado de la muestra biológica, ya que generalmente se trabaja con suero o plasma directamente.

Respecto a las desventajas de los métodos biológicos se pueden mencionar:

- 1) Inespecificidad. Aunque una reacción inmunológica antígeno-anticuerpo es altamente específica por sí misma, los inmunoensayos son afectados por reactividad cruzada y heterogeneidad de los anticuerpos. Algunos compuestos estructuralmente relacionados con el fármaco original (productos de

biotransformación o fármacos de la misma clase farmacológica p. ej. penicilinas), pueden reaccionar en forma cruzada con el anticuerpo en un porcentaje dado; por otra parte el título de los antisueros obtenidos en animales, cambian de un lote a otro y por lo tanto los anticuerpos varían en su grado de diferenciación entre el fármaco y sus derivados.

## **2. Métodos físico-químicos**

Respecto a los métodos físico-químicos la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y la espectrofotometría son de los dos más utilizados para la cuantificación de sustancias en fluidos biológicos.

Los métodos espectrofotométricos en general permiten realizar mediciones de una manera fácil y rápida con una precisión excelente, aquí también se incluye a la colorimetría, un método alternativo muy utilizado, ya que por medio de él es posible que se den coloraciones a través de reacciones con determinados grupos estructurales de la molécula, que diferencian perfectamente el componente a medir. Entre las ventajas de la espectrofotometría se encuentra su bajo costo comparado con otros métodos, además de su rapidez y precisión; entre sus desventajas se puede mencionar la falta de especificidad en muchas ocasiones debido a la interferencia que se encuentra en los productos de descomposición, los cuales en ocasiones pueden presentar un espectro idéntico al componente sin degradar y en otras la concentración a determinar es muy pequeña y está por debajo del límite de sensibilidad del método o dentro de su error experimental; además en las reacciones de color se puede presentar el problema de que ciertos grupos

funcionales den coloraciones similares a las estudiadas, llevando ésto a un error en la cuantificación realizada.

En cuanto a la cromatografía su complejidad va desde el más simple como es la cromatografía en capa delgada y papel hasta lo más sofisticado como la CLAR. Los métodos en capa delgada han recibido principal atención en la problemática de la estabilidad, debido a su rapidez y sencillez, así como por su bajo costo, lo que conjugado con la gran información que brinda lo hace muy útil y aconsejable.

La cromatografía líquida de alta resolución ha encontrado amplia aplicación debido a que entre sus múltiples ventajas posee la de emplear detectores no destructivos lo que permite recolectar con un alto grado de pureza aquellos componentes de los que se desee estudiar su estructura, en particular mediante métodos espectroscópicos para deducir la misma y poder obtener una mejor comprensión del mecanismo de la descomposición del principio activo en caso de que sea desconocido. Aunque el costo inicial del equipo y los solventes son altos, la rapidez del análisis, la cantidad de información obtenida, la pequeña cantidad de muestra, así como la forma de introducir la misma en el sistema, la cual puede ser inyectada empleando solventes acuosos y el número de análisis que se pueden realizar por sesión, hace del mismo un método ideal para este tipo de estudios. <sup>(9,10)</sup>

## **1.2 Principios para establecer la validación del método en fluidos biológicos**

Los parámetros esenciales para asegurar la aceptabilidad en la realización de un método analítico son: la estabilidad del fármaco en la matriz bajo condiciones de almacenaje en el estudio, exactitud, precisión, especificidad y concentración-respuesta. La validación de un método analítico para fluidos biológicos puede consistir de dos distintas fases: 1) el desarrollo de la fase, en donde el ensayo es definido y, 2) la aplicación de la fase, en donde el método es aplicado para el análisis de muestras para estudios Farmacocinéticos, de Biodisponibilidad o Bioequivalencia.

- Siempre que sea posible la misma matriz biológica debe ser utilizada en las muestras analizadas. La estabilidad de la sustancia de interés (fármaco y/o sus metabolitos) en la matriz durante el proceso de colección y el período de almacenamiento debe de ser valorado de preferencia antes del análisis de la muestra, es recomendable que la estabilidad de la sustancia en la matriz en dosis a sujetos sea estudiada. La exactitud, precisión, función de la respuesta y la especificidad del método con respecto a sustancias endógenas, metabolito (s) y productos de degradación deben de ser establecidos con referencia a la matriz biológica. Con respecto a la especificidad debe de existir evidencia de que la sustancia cuantificada es la sustancia de interés.
- El rango de concentraciones de la sustancia de interés debe de ser determinado y definido en el método, en base al análisis de muestras

(incluyendo variaciones estadísticas); este procedimiento define a la curva patrón.

- ♦ Es necesario el uso de un número suficiente de muestras para definir adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, esta relación debe de ser continua y reproducible. El número de concentraciones a utilizar debe de estar en función del rango y de la naturaleza concentración-respuesta; en muchos casos entre cinco y ocho concentraciones (excluyendo el blanco) deben de ser definidas en la curva patrón.
- ♦ La exactitud y precisión de las concentraciones de la sustancia en la matriz biológica deben de ser determinadas y demostradas, dentro y entre corridas (debe de ser calculada con un procedimiento estadístico apropiado). La determinación de la exactitud y precisión debe de ser efectuado por una serie de análisis de réplicas de las muestras de la sustancia en las concentraciones equivalentes en la matriz biológica. Se debe de representar el rango completo de la curva de calibración: un punto cerca del límite inferior de cuantificación (LIC), un punto cerca del centro y uno cerca del límite superior de dicha curva.
- ♦ El límite inferior de cuantificación (LIC) es la concentración más baja de la curva patrón que puede ser medida con exactitud y precisión aceptable, este parámetro debe de ser determinado en al menos cinco muestras independientes de la sustancia de interés y por la determinación del coeficiente de variación y/o un apropiado intervalo de confianza. El LIC es

la concentración más baja de la curva patrón y no debe de confundirse con el límite de detección.<sup>(8)</sup>

### **1.3 Definición de algunos parámetros analíticos**

**1. Concentración-respuesta:** la concentración-respuesta de un método es su capacidad de respuesta directamente proporcional a la cantidad de sustancia de interés presente en la muestra, por lo tanto para que las cantidades cuantificadas del fármaco sean reales debe de trabajarse siempre dentro del rango de linealidad del método. Para valorar este parámetro se utiliza el coeficiente de correlación ( $r$ ) que indica el grado en que se asocian dos variables, una vez obtenido se puede calcular el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el cual indica la variabilidad explicada por la recta de regresión, el criterio para considerar que hay una buena asociación entre las dos variables es que el valor de  $r^2$  sea lo más cercano a la unidad.

**2. Estabilidad de la muestra:** ésta se debe de establecer durante la toma, almacenamiento y marcha analítica de las muestras debido a la compleja naturaleza de la muestra y su potencial de reactividad, se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones; se almacenan las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc), durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Se reanalizan bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de



referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico, la determinación debe ser efectuada por un mismo analista. Se utiliza el siguiente criterio: la muestra es estable si el IC (intervalo de confianza) para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no excede el porcentaje establecido para métodos espectrofotométricos  $\pm 3\%$ , con respecto al factor I para cada condición/tiempo se debe de cumplir el criterio para métodos espectrofotométricos (97-103%).

**3. Especificidad:** con esta prueba se asegura que la respuesta obtenida es debida a la sustancia de interés y no a otros componentes presentes en la muestra analizada.

**4. Exactitud:** es la cuantificación del valor real o verdadero de la especie química de interés, el criterio de aceptación indica que el coeficiente de variación no puede ser más del 15%.

**5. Precisión:** es la proximidad entre los resultados obtenidos en determinaciones repetidas de una sustancia de interés durante un ensayo, este parámetro puede ser subdividido en precisión dentro de un día o intradía y precisión entre días o interdías; el criterio de aceptación indica que el coeficiente de variación no debe ser más del 15%, aquí el criterio de aceptación para el coeficiente de variación es muy amplio, debido a que se trabaja con matrices biológicas y en donde factores inherentes a éstas influirán en los resultados obtenidos.<sup>(8,9)</sup>

## 2. SULFONAMIDAS

Con el nombre de sulfonamidas o sulfomidas se designan a cualquiera de un grupo de compuestos caracterizados por la presencia de azufre y nitrógeno al mismo tiempo, con especificidad por ciertas bacterias; además de ser derivados de la sulfanilamida o p-aminobencensulfonamida. Existen aproximadamente 5000 sulfonamidas de las cuales sólo unas cuantas son las que se utilizan en la terapéutica debido a que son más eficaces y menos tóxicas.

La estructura básica de las sulfonamidas se muestra en la figura 1. contiene dos átomos de nitrógeno, uno amídico ( $N_1$ ) y otro amínico ( $N_2$ ).<sup>(11)</sup>

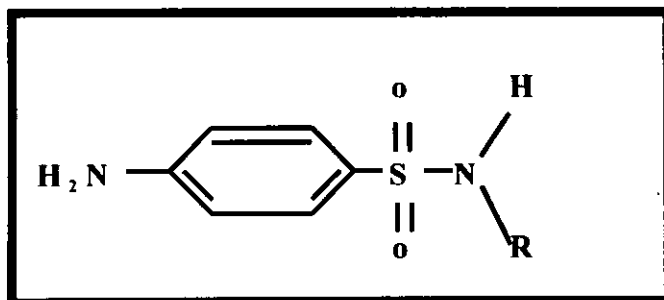


Fig.1 Sulfonamida  $N^1$  sustituida

Así, las diferentes sulfonamidas resultan de la sustitución de uno de los hidrógenos del nitrógeno amídico ( $N_1$ ). El requisito mínimo y necesario para la acción antibacteriana es la presencia de la sulfanilamida, donde grupo

amino ( $N_4$ ) debe de estar libre y en posición “para” en el anillo bencénico. Si el grupo amino se encuentra sustituido se pierde la actividad “in vitro”, pero “in vivo” se activa debido a la hidrólisis que sufre en el organismo.

En los casos en los que la sustitución se localiza en el grupo amídico ( $N_1$ ) la actividad antibacteriana aumenta, como sucede cuando el sustituyente es algún anillo heterociclo. Otro factor importante es la disociación, ya que los iones son más activos que los compuestos sin disociar, por lo que la actividad farmacológica depende de la constante de disociación pKa. <sup>(12,13)</sup>

Por otro lado el mecanismo de acción de las sulfonamidas se explica por medio de la Teoría de Woods-Filder, que establece que las sulfonamidas actúan combinándose con el sistema enzimático que normalmente ejerce su acción sobre el ácido p-aminobenzoico (PABA), evitando la transformación del PABA en dihidrofolato necesario para la síntesis del tetrahidrofolato que requieren las bacterias para su metabolismo normal. <sup>(14,15)</sup>

Las sulfonamidas son eficaces in vitro e in vivo contra S. hemoliticus, son efectivas en el tratamiento de infecciones causadas por ciertos cocos grampositivos, diplococos y bacilos gramnegativos; no es efectiva en enfermedades virales, en infecciones por Rickettsias, en sífilis o tuberculosis. Una de las aplicaciones más importantes y que está en gran auge se presenta en el sinergismo, donde la asociación con otros compuestos produce fármacos de mayor eficacia; así las sulfonamidas y la penicilina G presentan sinergismo en la meningitis por cocos, otro caso es la sulfanilamida y la estreptomycinina en el tratamiento de la brucelosis. Otro sinergismo y de mayor importancia

es el del sulfametoxazol con una diaminopirimida, el trimetoprim, que es un inhibidor de la reductasa de la dihidrofolato microbiana, enzima que reduce el dihidrofolato a tetrahidrofolato, lo que inhibe el crecimiento y desarrollo bacteriano. <sup>(16,17,18)</sup>

## **2.1 Absorción, distribución, biotransformación y eliminación de las sulfonamidas**

Salvo las sulfonamidas sintetizadas especialmente para ejercer efectos locales en el intestino, los fármacos de esta categoría se absorben en vías gastrointestinales. Se sabe que se absorbe de 70 a 100% de la dosis oral y la sulfonamida se detecta en la orina en término de treinta minutos luego de su consumo. En cuestión de dos a seis horas, aparecen valores plasmáticos máximos según el tipo de fármaco, el intestino delgado es el órgano principal de absorción, pero parte del medicamento se absorbe en estómago. Es variable y poco fiable la absorción en otros sitios como vagina, vías respiratorias o piel escoriada, pero una cantidad suficiente puede penetrar en el organismo hasta causar reacciones tóxicas en sujetos sensibles o producir sensibilización.

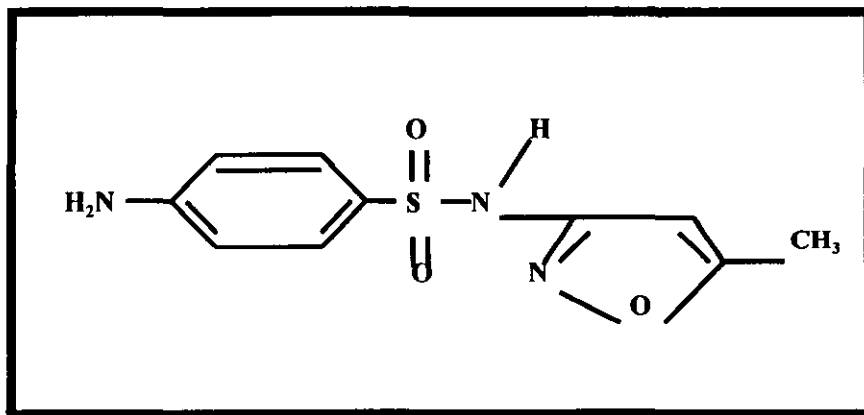
Las sulfonamidas se difunden por todos los tejidos corporales, la fracción difusible de sulfadiazina se distribuye de modo uniforme en el agua corporal total, en tanto que el sulfisoxazol queda confinado al espacio extracelular. Las sulfonamidas se difunden fácilmente en líquidos pleural,

peritoneal, sinovial, ocular y otros similares y, en ellos, pueden alcanzar concentraciones de 50 a 80% de la que se mide simultáneamente en sangre. El contenido proteínico de los líquidos mencionados es pequeño y, por tal razón, el fármaco aparece en la forma activada no ligada.

Las sulfonamidas presentan alteraciones metabólicas in vivo, en particular en el hígado, el principal derivado metabólico es la sulfonamida con acetilación en N<sup>4</sup>. Es desventajosa la acetilación que surge en diferente magnitud para cada medicamento porque los productos resultantes carecen de actividad antibacteriana, pero aún así no pierden las capacidades tóxicas de la sustancia original.

Las sulfonamidas se eliminan del organismo, en parte, en la forma original sin cambios y, en parte, en forma de productos metabólicos. La fracción de mayor magnitud se excreta por orina y el período de semieliminación de las sulfonamidas depende de la función renal, cantidades pequeñas de los fármacos se eliminan en heces, bilis, leche materna y otras secreciones. <sup>(19,20)</sup>

### 3.MONOGRAFIA DEL SULFAMETOXAZOL



$C_{10}H_{11}N_3O_3S$

MM. 253.3

4-amino-N-(5-metilisoxazolil-3)bencensulfonamida

Es un polvo cristalino, blanco o blanco amarillento inodoro. Contiene no menos del 98.5 por ciento y no más del 101 por ciento de  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$  calculado en la sustancia seca.

Fácilmente soluble en acetona, soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos; poco soluble en alcohol; muy ligeramente soluble en agua, éter y cloroformo. Tiene una temperatura de fusión entre 168 y 172 °C, no presenta actividad óptica. <sup>(21)</sup>

El sulfametoxazol es preparado por medio de la reacción entre el 5-metil-3-aminoisoxazol con el N-acetil-p-benceno clorhidrosulfonil, posteriormente el producto de esta reacción es hidrolizado produciendo el 5-metil-3-sulfanilamida-isoxazol (sulfametoxazol).

En la figura 2 se muestra el espectro ultravioleta del sulfametoxazol cuando es obtenido entre 225 a 350 nm, un máximo y un mínimo es observado, el máximo se localiza a 256-257 nm ( $\epsilon=1.72 \times 10^{-4}$ ) y el mínimo a 235-236 nm. Este espectro fue obtenido de una solución de 0.008 mg/ml de sulfametoxazol utilizando una solución de NaOH 0.1M como solvente. <sup>(22)</sup>

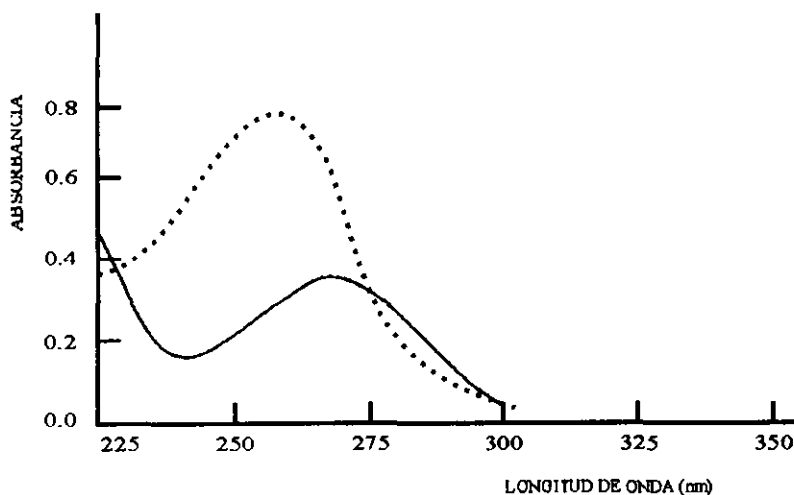


Fig.2 Espectro UV del sulfametoxazol utilizando NaOH 0.1M como solvente a una concentración de 0.008 mg/ml

## 4. ESPECTROFOTOMETRIA

La radiación electromagnética es una forma de energía radiante, el espectro electromagnético cubre un amplio intervalo de energía radiante, incluyendo desde los rayos gamma, de longitud de onda corta, hasta las ondas de radio, de longitud de onda larga. El espectro electromagnético se divide en regiones, que abarca intervalos de longitudes de onda más estrechos, así el ojo humano responde a la radiación electromagnética entre los 380 y 750 nm. En la región visible, la luz se descompone en colores primarios y sus colores complementarios, de esta manera si se hace incidir un haz de luz blanca sobre una solución que absorbe luz a una longitud de onda determinada, ésta transmitirá todas las demás longitudes de onda, apareciendo a la vista del color complementario al que corresponde a la longitud de onda absorbida.

Cuando se produce una interacción entre un haz de luz y la materia, se producen, entre otros, fenómenos de absorción o emisión energética; la medida de la cantidad de luz absorbida por una solución de una especie absorbente, es el fundamento en que se basan las técnicas de Espectrofotometría de absorción.<sup>(23)</sup>

Cuando la radiación electromagnética viaja a través de un medio que contiene átomos, moléculas o iones, pueden suceder varias cosas:

- 1) La intensidad de la energía emergente es idéntica a la intensidad de la energía incidente, esto indica que no ha habido absorción de la radiación.
- 2) Puede haber reflexión, refracción y/o dispersión.



3) La intensidad de la energía emergente es menor que la de la energía incidente, esto indica que ha habido cierta absorción y como resultado de esta absorción, las especies en solución se activan desde su menor nivel de energía (estado basal) a estados de mayor energía (estados excitados).

Para que haya absorción, la energía de la radiación excitadora debe igualar la diferencia de energía cuantizada existente entre el estado basal y uno de los estados excitados de las especies, en la espectrofotometría visible y ultravioleta, la energía de la radiación puede excitar sólo los electrones más externos o de la valencia. La vida del estado excitado es breve ( $10^{-8}$  -  $10^{-9}$  seg.); su existencia termina por algunos de los procesos de relajación. La relajación más común se verifica a través de la producción de calor, que puede causar un ligero incremento en la temperatura del medio. Otra forma de relajación ocurre como la descomposición del estado excitado en especies nuevas (reacciones fotoquímicas) de acuerdo con la siguiente ecuación:



Alternativamente, la relajación puede dar como resultado la emisión de radiación a longitudes de onda específicas características de las especies excitadas (espectroscopía de emisión), o la emisión de radiación a longitudes de onda mayores que el haz incidente, inmediatamente (fluorescencia) o después de un corto tiempo (fosforescencia).<sup>(24)</sup>

Por otro lado como se mencionó anteriormente, las bandas de absorción en el ultravioleta y el visible se deben a transiciones electrónicas en la región de los 200 a 780 nm. En el caso de moléculas orgánicas, las transiciones electrónicas pueden atribuirse a las transiciones electrónicas  $\sigma$ ,  $\pi$ ,  $\eta$  desde el estado basal a un estado excitado ( $\sigma^*$  &  $\pi^*$ ).

Como el electrón  $\sigma$  está firmemente implicado en la construcción de una sola ligadura, su transición requiere mucho más energía (usualmente en el ultravioleta lejano) que el electrón  $\pi$  (electrones que no son de unión) o menos fuertemente unidos (electrones  $\pi$ ).

Hay cuatro tipos de bandas de absorción que existen debido a la transición electrónica de una molécula:

Bandas R :  $n \longrightarrow \pi^*$ , en compuestos con C=O o grupos  $\text{NO}_2$   $\epsilon_{\text{máx}}$   
<100

Bandas K :  $\pi \longrightarrow \pi^*$ , en sistemas conjugados  $\epsilon_{\text{máx}}$  mayor que  
10.000

Bandas B : (bandas bencenoides) : debido a sistemas aromáticos y heteroaromáticos.

Bandas E : (bandas etilénicas) : en sistemas aromáticos. <sup>(25,26)</sup>

## 4.1 Ley de Beer

Si la luz incide con longitud de onda  $\lambda$  e intensidad  $I_0$  llega a una solución con concentración,  $c$ , y con un trayecto,  $l$ , de un centímetro, la energía radiante de la luz se disminuye en forma exponencial, de este modo, si la concentración dada de sustancia absorbe el 50% de la radiación incidente, al duplicar la concentración no absorberá el 100% sino el 75% de la luz.

### **Ecuación utilizada en espectrofotometría**

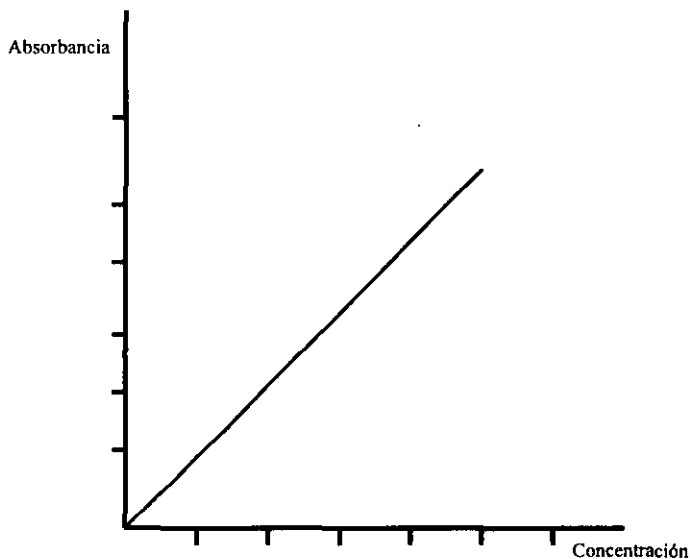
$$\log ( I_0 / I ) = \epsilon cl$$

donde  $I_0$  es la intensidad de la energía incidente,  $I$  es la intensidad de la energía emergente,  $c$  la concentración,  $l$  el espesor del absorbente (en cm), y  $\epsilon$  es la absorptividad molar (expresada anteriormente como coeficiente de extinción molar) para la concentración en moles/L.

Si se expresa la concentración en gramos/L, la absorptividad se designa por  $a$  en lugar de  $\epsilon$ . El término  $\log I_0 / I$  o  $\log ( I / T )$  se llama absorbancia,  $A$  (anteriormente designada como densidad óptica o extinción);  $T$  es transmitancia o  $I_0 / I$ .

Uno de los usos principales de la espectrofotometría ultravioleta y visible es para la realización de mediciones cuantitativas; una concentración

desconocida de un compuesto conocido, si se conforma a la ley de Beer, puede ser determinada utilizando la ecuación anterior. La curva representativa de la ley de Beer se presenta a continuación en la figura 3., se construye mediante la graficación de la absorbancia (A) vs la concentración.<sup>(27)</sup>



**Fig.3 Gráfico representativo de la ley de Beer**

Finalmente es bueno tomar en consideración las limitaciones de la ley de Beer, algunas de esas limitaciones tienen naturaleza tan fundamental que constituyen una real limitación de la ley; se deben al hecho de que ésta no toma en consideración los efectos del pH, la temperatura, las interacciones

soluto-solvente y soluto-soluto, por ejemplo asociación (enlaces de hidrógeno intermoleculares), disociación, reacción química, etc. Debido a estas limitaciones, la ley se aplica usualmente sólo para soluciones diluidas, donde estas interacciones son insignificantes. <sup>(28,29)</sup>

# **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Dentro de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo se imparte la materia de Biofarmacia en la cual, para el cumplimiento de sus objetivos se desarrollan prácticas de Biodisponibilidad y Farmacocinética en donde la utilización de métodos analíticos validados para la cuantificación de los fármacos son indispensables; en cuanto a los métodos actuales la tendencia es utilizar técnicas analíticas soportadas en la Cromatografía de Gases o Cromatografía Líquida de Alta Resolución, las cuales tienen la ventaja de ser muy eficaces, precisas y exactas, pero poco accesibles en cuanto a costos para un laboratorio con fines docentes, ésto nos lleva a plantear como una buena opción los métodos analíticos que utilizan técnicas espectrofotométricas, que puedan ser utilizadas con seguridad y confianza a través de ser validadas, ya que mediante la validación se determina la especificidad, concentración-respuesta, exactitud y precisión del método analítico, lo cual asegura la confiabilidad de los resultados obtenidos.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de obtener una metodología analítica confiable para cuantificar sulfametoxazol en micromuestras de sangre de rata que pudiera ser empleada para la evaluación e interpretación de datos de Biodisponibilidad y Farmacocinética de este fármaco en el Laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

# **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

- ◆ Optimizar y validar un método colorimétrico para cuantificar sulfametoxazol en micromuestras de sangre de rata.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- ◆ Implementar y optimizar el método colorimétrico para cuantificar sulfametoxazol en micromuestras de sangre de rata.
- ◆ Validar el método colorimétrico determinando la estabilidad, especificidad, concentración-respuesta, exactitud y precisión en micromuestras de sangre de rata.

## **HIPOTESIS**

Si se realizan los ajustes necesarios para obtener un método colorimétrico para cuantificar sulfametoxazol en micromuestras de sangre de rata y posteriormente éste se valida, entonces se logrará contar con un método analítico susceptible de ser aplicado en estudios de Farmacocinética y Biodisponibilidad.



# MATERIAL

- Matraces volumétricos de 100, 50 y 10 ml
- Matraces erlenmeyer de 125 y 250 ml
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Pipetas volumétricas de 1 y 5 ml
- Embudos de vidrio tallo corto y largo
- Anillos de fierro
- Soportes Universales
- Probetas de 500, 250 y 100 ml
- Perilla de seguridad
- Gradillas
- Tubos de ensaye pequeños
- Tubos capilares heparinizados
- Cámara de elución
- Placas cromatográficas
- Buretas de 25 y 50 ml
- Mecheros Bunsen y Fisher

- Malla de asbesto
- Tripié
- Crisoles porcelana
- Tubos Nessler medianos
- Papel filtro Whatman #12
- Celdas para espectrofotómetro de vidrio
- Papel aluminio
- Baño María
- Vasos de precipitados de 50, 100, 150, 250, 500 y 1000 ml pyrex
- Pesafiltro
- Termómetro (-10 a 120°C )
- Tubo de Thile
- Sonda punta redonda de látex modelo nelatón calibre 8

## REACTIVOS

- Acido sulfúrico R.A. J.T. Baker
- Acido clorhídrico R.A. J.T. Baker
- Alcohol etílico R.A. Merck
- Sulfametoxazol (materia prima) grado farmacéutico
- Eter R.A. Merck
- Cloroformo R.A. Productos Químicos Monterrey, S.A.
- Hidróxido de sodio R.A. Merck
- Hidróxido de potasio R.A. J.T. Baker
- Hipoclorito de sodio R.A. Merck
- 2-naftol R.A. J.T. Baker
- Fenol R.A. Laboratorios Grin S.A de C.V.
- Nitrato de plomo R.A. J.T. Baker
- Hidróxido de amonio R.A. J.T. Baker
- Sulfanilamida P.P. Sigma
- Acido acético R.A. J.T. Baker
- Dimetilformamida R.A. J.T. Baker
- 1-butanol R.A. Merck

- 4-dimetilaminobenzaldehído R.A. J.T. Baker
- Estándar de sulfametoxazol P.P. Sigma
- Acido tricloroacético R.A. J.T. Baker
- Nitrito de Sodio R.A. Merck
- Sulfamato de amonio R.A. Merck
- N-(1-naftil)-etilendiamina hidroclicorada R.A. J.T. Baker

## **EQUIPO**

- Balanza analítica Mettler H35AR
- Centrífuga SOL-BAT (Aparatos científicos MOD.J-12)
- Mufla Type 1400 Furnace 6. Lindberg Mod.5
- Estufa Riossa Mod.H5
- Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2UV/VIS
- Placa de calentamiento y agitación furnace-lindberg 164.J65
- Vórtex Midler Mod.RJH037

## **MATERIAL BIOLÓGICO**

- Ratas Wistar macho

# DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGIA

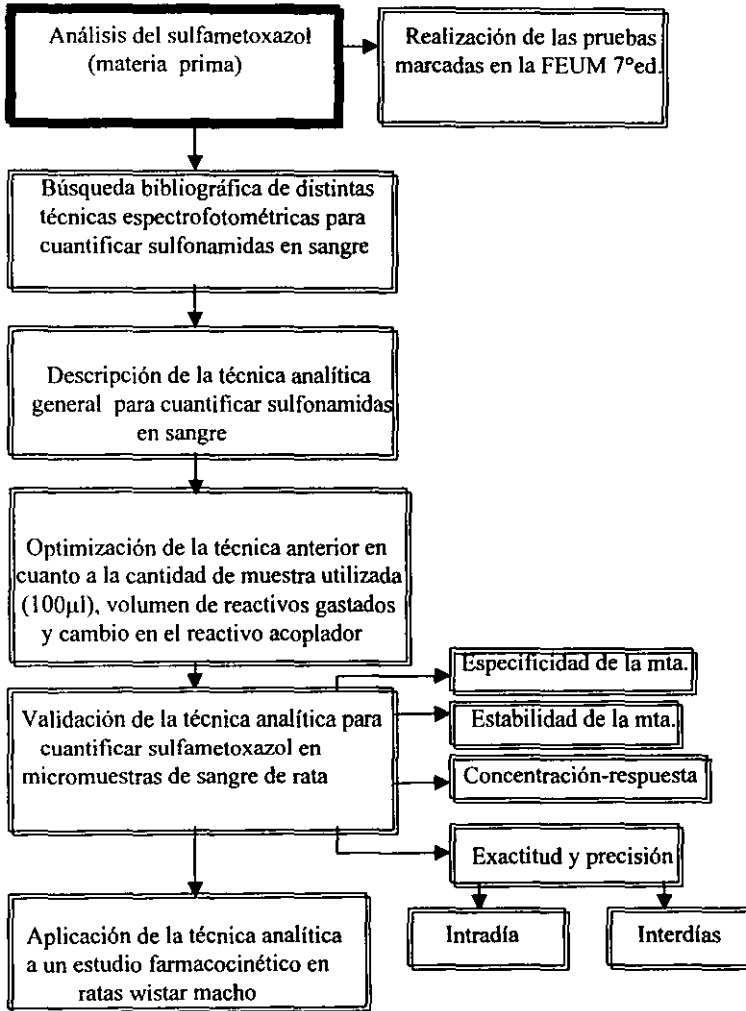


Diagrama 1

# METODOLOGIA

## 1. ANALISIS DEL SULFAMETOXAZOL (MATERIA PRIMA)

Primeramente se realizó el análisis del sulfametoxazol (materia prima), para lo cual, se efectuaron las pruebas reportadas en la monografía de la Farmacopea Mexicana 7ª edición; para saber si se encontraba dentro de especificaciones:

**1. Descripción:** polvo cristalino, blanco o blanco amarillento, inodoro.

**2. Solubilidad:** fácilmente soluble en acetona, soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos, poco soluble en alcohol, muy ligeramente soluble en agua, éter y cloroformo.

**3. Ensayos de identidad:** se llevaron a cabo las siguientes cuatro pruebas:

**A.** El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión de la muestra, previamente seca, en bromuro de potasio, exhibe máximos a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de SRef de sulfametoxazol.

**B.** El espectro de absorción en la región ultravioleta de una solución 1 en 100 000 en solución (1 en 250) de hidróxido de sodio, presenta máximo y mínimo a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de SRef de sulfametoxazol y las respectivas absortividades, calculadas en la sustancia seca, a la longitud de onda de máxima absorbancia a aproximadamente 257 nm no difieren en más de 2 por ciento.

**C.** Da positiva la reacción característica de aminas aromáticas primarias formándose un precipitado rojo anaranjado.

**D.** Disolver aproximadamente 5 mg de la muestra en 0.5 ml de solución 2M de hidróxido de sodio, agregar 5 ml de agua y 100 mg de fenol, calentar a ebullición, enfriar y agregar 1 ml de solución diluida al 4 por ciento m/v de hipoclorito de sodio, aparece inmediatamente un color amarillo dorado persistente.

**4. Claridad y olor de la solución:** una solución al 5 por ciento m/v de la muestra en solución 2 M de ácido clorhídrico, es clara y no más colorida que una solución de referencia.

**5. Temperatura de fusión:** entre 168 y 172 °C.

**6. pH:** entre 4 y 6. Utilizar una suspensión al 10 por ciento m/v de la muestra en agua libre de dióxido de carbono.

**7. Metales pesados:** no más de 20 ppm.

**8. Pérdida por secado:** no más de 0.5 por ciento, secar 4 horas a 105 °C.

**9. Residuo de la ignición:** no más de 0.1 por ciento.

**10. Sustancias relacionadas:** pasa la prueba.

**11. Valoración:** se disolvieron aproximadamente 500 mg de la muestra en una mezcla de 20 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua, se agregaron 15 ml de ácido clorhídrico. Se enfrió a 15 °C y tituló inmediatamente con solución 0.1M de nitrito de sodio determinando el punto final potenciométricamente, utilizando un sistema de electrodos de calomel-platino. Cada ml de solución 0.1M de nitrito de sodio equivale a 25.33 mg de  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ .



## 2. DIAGRAMA DE LA TECNICA ANALITICA GENERAL PARA CUANTIFICAR SULFONAMIDAS EN SANGRE

En el diagrama 2 se muestran los pasos a seguir para cuantificar cualquier sulfonamida que contengan el grupo aril amino en su estructura:

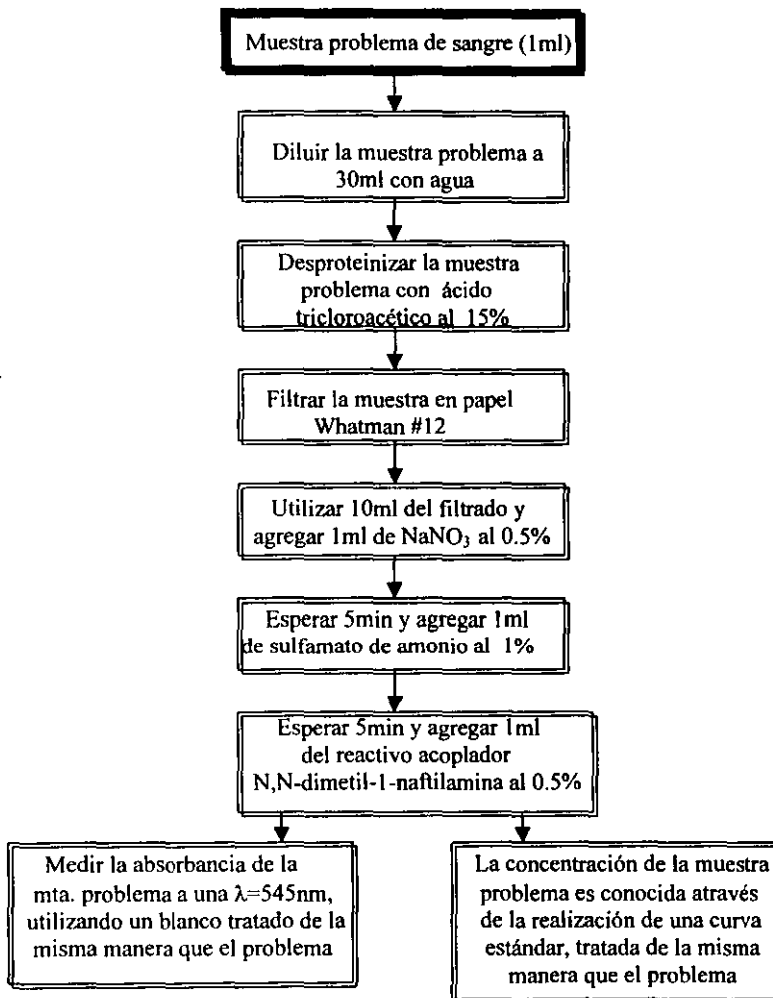
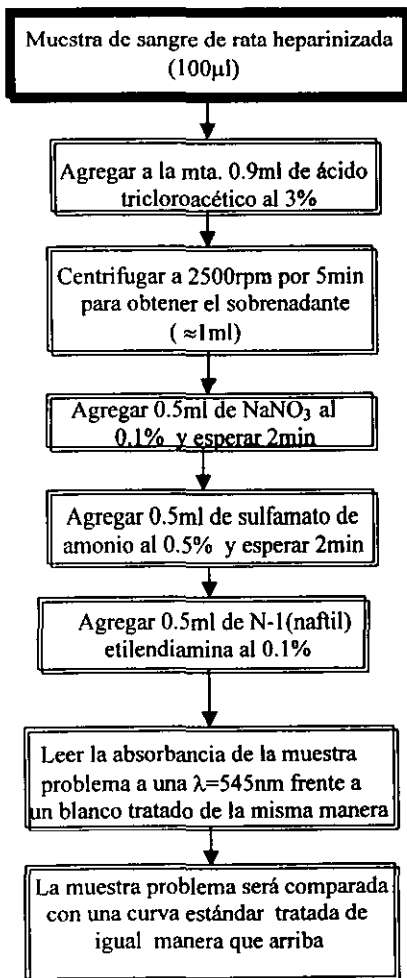


Diagrama 2

### 3. DIAGRAMA DE LA TECNICA ANALITICA OPTIMIZADA PARA CUANTIFICAR SULFAMETOXAZOL EN MUESTRAS DE SANGRE

En el diagrama 3 se muestra la optimización realizada a la técnica descrita en el diagrama 2 en cuanto a la cantidad de muestra utilizada (100 $\mu$ l), volumen de reactivos gastados y reactivo acoplador utilizado:



**Diagrama 3**

#### **4.VALIDACION DEL METODO**

Posterior a la búsqueda bibliográfica de las diferentes técnicas espectrofotométricas utilizadas para la cuantificación de sulfametoxazol en sangre, se compararon las diferentes técnicas encontradas, diferentes reactivos utilizados en cada una de ellas, rangos de concentración detectados, etc. y en base a esto se definió y posteriormente se optimizó la técnica -descrita en el diagrama 3- a utilizar a lo largo de toda la validación determinando la metodología utilizada para cada uno de los parámetros de validación:

**4.1 ESPECIFICIDAD:** para realizar este parámetro la siguiente reacción se llevó a cabo por sextuplicado a partir de seis matrices independientes de sangre de rata procediendo de la siguiente manera:

Se preparó una solución madre de sulfametoxazol de 0.5g en 25ml de NaOH 0.1N teniendo una concentración de 20mg/ml, 1ml de la solución madre se llevó al aforo en un matraz de 10ml teniendo una concentración de 2mg/ml, a 0.1 ml de la solución anterior se agregaron 0.9ml de sangre de rata heparinizada para tener una concentración de 0.2mg/ml, a 0.1ml de la solución anterior se agregaron 0.9ml de ácido tricloroacético al 3% para tener una concentración de 20µg/ml, se mezcló en vórtex y posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 5 min., se utilizó el sobrenadante y se le adicionó 0.5ml de nitrito de sodio al 0.1%, dejando reposar en la oscuridad por dos min., se adicionó 0.5ml de sulfamato de amonio al 0.5% dejando reposar en la oscuridad por dos min. para finalmente agregar 0.5ml de N-1(naftil)etilendiamina al 0.1% dejando desarrollar un color rojo púrpura.

Posteriormente la reacción antes mencionada se llevó a cabo por sextuplicado a partir de seis matrices independientes de sangre de rata sin adicionar sulfametoxazol, sustituyendo el volumen de éste por agua destilada.

**4.2 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:** este parámetro se realizó mediante la comparación de los resultados obtenidos de los análisis iniciales de tres muestras, con los datos obtenidos de un igual número de muestras después de permanecer 24, 48 y 72hrs. a  $-2^{\circ}\text{C}$ ; en dos concentraciones diferentes 14 y  $26\mu\text{g/ml}$ , procediendo de la siguiente manera:

1. Se preparó una solución madre de sulfametoxazol de  $0.5\text{g}/25\text{ml}$ , posteriormente se añadieron a matraces volumétricos de 10 ml las siguientes cantidades 0.7 y 1.3ml de solución para tener las siguientes concentraciones 1.4 y  $2.6\text{mg/ml}$ .
2. Se utilizó 0.1ml de cada solución y se agregaron 0.9ml de sangre de rata heparinizada (teniendo concentraciones de 0.14 y  $0.26\text{mg/ml}$ ).
3. Se utilizaron 0.1ml de las soluciones anteriores y se agregaron 0.9ml de ácido tricloroacético al 3% (teniendo concentraciones de 14 y  $26\mu\text{g/ml}$ ).
4. Se mezclaron los tubos en vórtex y posteriormente se centrifugaron a 2500rpm por 5min. se utilizó el sobrenadante para posteriormente adicionarle 0.5ml de nitrito de sodio al 0.1%, dejando reposar en la oscuridad por dos minutos.
5. Se adicionó a cada tubo 0.5ml de sulfamato de amonio al 0.5% dejando reposar en la oscuridad 2min. para finalmente agregar 0.5ml de N-1 (naftil)etilendiamina al 0.1% dejando desarrollar un color rojo púrpura que

se leyó a 545nm, esta reacción se hizo por triplicado y se tomó como la concentración inicial, bajo las mismas condiciones se prepararon las muestras necesarias para ser sometidas a las condiciones de almacenaje que se deseaban estudiar (24, 48 y 72hrs a -2°C) y así observar su estabilidad.

**4.3 CONCENTRACION-RESPUESTA:** se realizaron varias pruebas para determinar la curva patrón (con los rangos de concentración a utilizar) adecuada para cantidades tan pequeñas como las que se utilizaron en esta técnica (micromuestras). Se utilizaron seis niveles de concentración más un blanco (8, 14, 20, 26, 32 y 38µg/ml) por sextuplicado de manera independiente y bajo las mismas condiciones de análisis procediendo de la siguiente manera:

1. Se preparó una solución madre de sulfametoxazol de 0.5g/25ml, posteriormente se añadieron a matraces volumétricos de 10ml las siguientes cantidades (0.4, 0.7, 1, 1.3, 1.6 y 1.9ml de solución) y se llevó al aforo con agua para tener las siguientes concentraciones 0.8, 1.4, 2, 2.6, 3.2 y 3.8mg/ml.
2. Se utilizaron 0.1 ml de cada solución y se agregaron 0.9ml de sangre de rata heparinizada (teniendo concentraciones de 0.08, 0.14, 0.2, 0.26, 0.32 y 0.38mg/ml).
3. Se emplearon 0.1 ml de cada una de las soluciones anteriores y se agregaron 0.9 ml de ácido tricloroacético al 3% (teniendo concentraciones de 8, 14, 20, 26, 32 y 38 µg/ml).
4. Se mezclaron los tubos en vórtex y posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min. se utilizó el sobrenadante para posteriormente

adicionarle 0.5 ml de nitrito de sodio al 0.1%, dejando reposar en la oscuridad por dos minutos.

5. Se adicionó a cada tubo 0.5 ml de sulfamato de amonio al 0.5% dejando reposar en la oscuridad 2 min. para finalmente agregar 0.5 ml de N-1 (naftil)etilendiamina al 0.1% dejando desarrollar un color rojo púrpura que se leyó a 545 nm.

**4.4 EXACTITUD Y PRECISION:** este parámetro se realizó a cuatro niveles de concentración (8, 18, 24 y 36  $\mu\text{g/ml}$ ) evaluando la precisión y exactitud intradía y la precisión y exactitud interdía.

**4.4.1 EXACTITUD Y PRECISION INTRADIA:** este parámetro se realizó con los cuatro niveles de concentración arriba mencionados, haciéndose el análisis por sextuplicado y en el mismo día de la siguiente forma:

1. Se preparó una solución madre de sulfametoxazol de 0.5g/25ml, posteriormente se añadieron a matraces volumétricos de 10 ml las siguientes cantidades (0.4, 0.9, 1.2 y 1.8 ml de solución) y se llevó al aforo con agua para tener las siguientes concentraciones 0.8, 1.8, 2.4 y 3.6 mg/ml.

2. Se utilizaron 0.1 ml de cada solución y se agregaron 0.9 ml de sangre de rata heparinizada (teniendo concentraciones de 0.08, 0.18, 0.24, y 0.36 mg/ml).

3. Se utilizaron 0.1 ml de cada una de las soluciones anteriores y se agregaron 0.9 ml de ácido tricloroacético al 3% (teniendo concentraciones de 8, 18, 24 y 36  $\mu\text{g/ml}$ ).

4. Se mezclaron los tubos en vórtex y posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min. se utilizó el sobrenadante para posteriormente

adicionarle 0.5 ml de nitrito de sodio al 0.1%, dejando reposar en la oscuridad por dos minutos.

5. Se adicionó a cada tubo 0.5 ml de sulfamato de amonio al 0.5% dejando reposar en la oscuridad 2 min. para finalmente agregar 0.5 ml de N-1 (naftil)etilendiamina al 0.1% dejando desarrollar un color rojo púrpura donde sus absorbancias fueron leídas a 545nm e interpolando su valor en una curva de concentración-respuesta obtenida el mismo día de análisis.

**4.4.2 EXACTITUD Y PRECISION INTERDIAS:** para evaluar este parámetro se siguió la metodología del punto 2.4.1 repitiendo ésta en tres días diferentes.

## 5. APLICACION DEL METODO ANALITICO PROPUESTO

Para determinar la utilidad del método en estudios biofarmacéuticos se tomaron muestras sanguíneas de 0.1 ml a ratas Wistar macho tratadas con sulfametoxazol por vía oral de la siguiente manera:

- Se pesaron e identificaron tres ratas wistar macho de entre 200-250g a las cuales se les tuvo sin probar alimento 24 hrs. antes del experimento.
- Se obtuvo una muestra de sangre de 0.1 ml del extremo de la cola de cada una de las ratas con tubos capilares heparinizados ( $t_0$ ).
- A cada una de las ratas se les administro por vía oral una solución de sulfametoxazol a una dosis de 1g/kg de peso con ayuda de una sonda nasogástrica No.8.
- Posteriormente se obtuvieron muestras de sangre (0.1 ml) del extremo de la cola de cada una de las ratas con capilares heparinizados a los 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 7, 9, 12, 13, 14 y 15 hrs. después de la administración de la solución del sulfametoxazol.
- Se colocaron en tubos de ensaye que contenían 0.9 ml de ácido tricloroacético al 3% las muestras de sangre y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min.
- Se utilizó el sobrenadante y se adicionó 0.5 ml de nitrito de sodio al 0.1%, dejando reposar en la oscuridad por dos min.
- Posteriormente se adicionó 0.5 ml de sulfamato de amonio al 0.5% dejando reposar en la oscuridad 2 min. para finalmente agregar 0.5 ml de N-1(naftil)etilendiamina al 0.1% dejando desarrollar un color rojo púrpura que se leyó a 545 nm.



# RESULTADOS

## 1. ANALISIS DEL SULFAMETOXAZOL (MATERIA PRIMA)

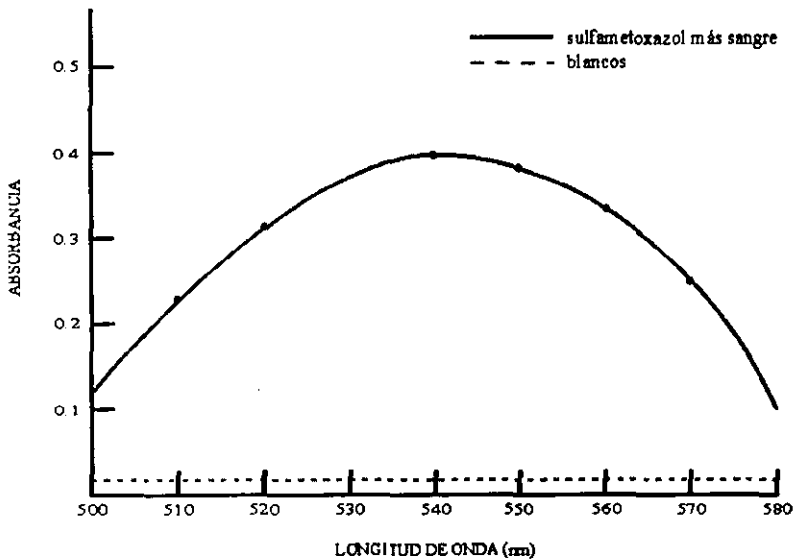
En la tabla I se muestran los resultados obtenidos al realizar cada una de las pruebas marcadas en la Farmacopea Mexicana 7a. Ed. para la materia prima de sulfametoxazol:

PRUEBA	RESULTADO	LÍMITE
Descripción	Pasa la prueba	Polvo cristalino, blanco o blanco amarillento, inodoro
Solubilidad	Pasa la prueba	Fácilmente soluble en acetona, soluble en hidróxidos alcalinos
Ensayos de identidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Claridad y olor de la solución	Pasa la prueba	Una solución al 5% es clara y no más colorida que una solución de Ref
Temperatura de fusión	169-171 °C	Entre 168 y 172 °C
pH	5.55	Entre 4 y 6
Metales pesados	Pasa la prueba	No más de 20 ppm
Pérdida por secado	0.57%	No más de 0.5%
Residuo de la ignición	0.095%	No más de 0.1%
Sustancias relacionadas	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Valoración	101.07%	Contiene no menos del 98.5 y no más del 101% de sulfametoxazol

Tabla I. Resultados obtenidos de todas las pruebas realizadas al sulfametoxazol (materia prima)

## 2.ESPECIFICIDAD

En la gráfica 1 se encuentra el espectro del sulfametoxazol una vez que se llevó a cabo la reacción mencionada en la metodología, observándose claramente que en las matrices independientes (sangre) no hubo respuesta alguna:



**Gráfica 1.** En esta gráfica se observa el espectro obtenido del sulfametoxazol en sangre de rata y el espectro de los blancos

### 3. ESTABILIDAD

Con la metodología mencionada anteriormente se compararon los resultados obtenidos del análisis de tres muestras iniciales, con los obtenidos de otras muestras después de ser mantenidas por 24, 48 y 72 hrs en refrigeración a  $-2^{\circ}\text{C}$  en dos concentraciones diferentes 14 y  $26\mu\text{g/ml}$  obteniéndose los siguientes resultados (en base a la información del anexo I):

#### PARA LA CONCENTRACION DE $14\mu\text{g/ml}$

En la tabla II se muestran los porcentos de recobro obtenidos a partir de las concentraciones interpoladas con las curvas patrón respectivas:

%REC. $t_0$	%REC. ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) 24 HRS	%REC. ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) 48 HRS	%REC. ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) 72 HRS.
100.19	101.28	100.30	99.01
100.63	101.71	100.74	99.87
100.63	100.84	99.87	99.01

Tabla II. Porcentos de recobro para la concentración de  $14\mu\text{g/ml}$  para el parámetro de estabilidad al tiempo inicial ( $t_0$ ) y a las 24, 48 y 72 hrs. después de ser resguardadas a  $-2^{\circ}\text{C}$

CALCULO DEL IC PARA LA TEMPERATURA DE ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) A LAS 24 HRS:

$$\text{IC} = (-0.12 \text{ a } 1.479)$$

CALCULO DEL FACTOR I:

$$I = \frac{101.088 + 101.073 + 100.209}{3} = 100.79\%$$

CALCULO DEL IC PARA LA TEMPERATURA DE ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) A LAS 48 HRS:

$$\text{IC} = (-0.859 \text{ a } 0.499)$$

CALCULO DEL FACTOR I:

$$I = \frac{100.109 + 100.109 + 99.245}{3} = 99.82\%$$

**PARA LA CONCENTRACION DE 26 µg/ml:**

En la tabla III se muestran los porcentos de recobro obtenidos a partir de las concentraciones interpoladas con las curvas patrón respectivas:

<b>% REC. t<sub>0</sub></b>	<b>%REC.(-2°C) 24 HRS</b>	<b>%REC.(-2°C)48HRS</b>	<b>%REC.(-2°C)72HRS</b>
100.69	100.86	100.78	100.20
100.22	100.39	100.54	99.97
100.46	100.86	100.31	100.20

Tabla III. Porcentos de recobro para la concentración de 26 µg/ml para el parámetro de estabilidad al tiempo inicial (t<sub>0</sub>) y a las 24, 48 y 72 hrs. después de ser resguardadas a -2°C

**CALCULO DEL IC PARA LA TEMPERATURA DE (-2°C) A LAS 24 HRS:**

$$\text{IC} = (-0.2437 \text{ a } 0.7237)$$

**CALCULO DEL FACTOR I:**

$$I = \frac{100.17 + 100.19 + 100.39}{3} = 100.25\%$$

**CALCULO DEL IC PARA LA TEMPERATURA DE (-2°C) A LAS 48 HRS:**

$$\text{IC} = (-0.3679 \text{ a } 0.5279)$$

**CALCULO DEL FACTOR I:**

$$I = \frac{100.09 + 100.32 + 99.85}{3} = 100.08\%$$

**CALCULO DEL IC PARA LA TEMPERATURA DE (-2°C) A LAS 72 HRS:**

$$\text{IC} = (-0.7037 \text{ a } 0.0237)$$

**CALCULO DEL FACTOR I:**

$$I = \frac{99.51 + 99.75 + 99.74}{3} = 99.67\%$$

#### 4. CONCENTRACION-RESPUESTA

En la tabla IV se presentan los resultados obtenidos al evaluar este parámetro:

CONCENTRACION DE SULFAMETOXAZOL ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABSORBANCIA $\lambda=545\text{nm}$
8	0.197
8	0.196
8	0.197
8	0.198
8	0.199
8	0.196
14	0.296
14	0.298
14	0.297
14	0.298
14	0.297
14	0.295
20	0.385
20	0.383
20	0.383
20	0.385
20	0.384
20	0.383
26	0.496
26	0.495
26	0.495
26	0.497
26	0.496
26	0.494
32	0.597
32	0.596
32	0.595
32	0.596
32	0.595
32	0.597
38	0.687
38	0.686
38	0.687
38	0.688
38	0.689
38	0.686

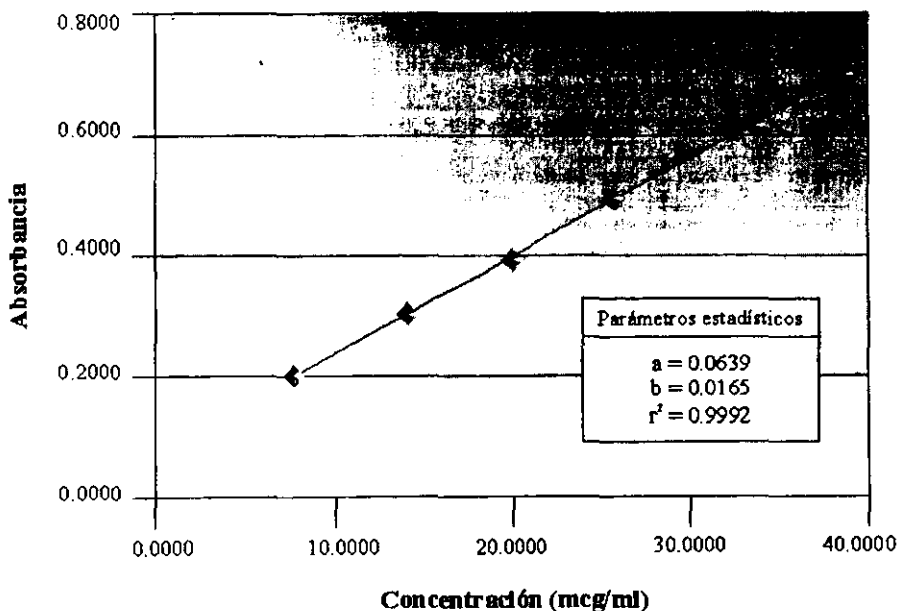
Tabla IV. Resultados de absorbancia obtenidos al evaluar por sextuplicado las concentraciones de sulfametoxazol en sangre de 8 a 38  $\mu\text{g/ml}$

En la Tabla V se presentan las concentraciones teóricas de sulfametoxazol en ( $\mu\text{g/ml}$ ), así como los promedios de la absorbancia con su respectivo error estándar para cada punto.

CONCENTRACION DE SULFAMETOXAZOL ( $\mu\text{g/ml}$ )	MEDIA DE ABSORBANCIA	$\pm$ ERROR ESTANDAR
8	0.197	0.0004
14	0.297	0.0004
20	0.384	0.0004
26	0.496	0.0004
32	0.596	0.0003
38	0.687	0.0004

Al graficar los datos de la tabla V (concentración vs absorbancia) se obtiene la gráfica II en donde se muestran los parámetros estadísticos: ordenada, pendiente y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ):

### CONCENTRACION - RESPUESTA PARA SULFAMETOXAZOL



Gráfica II. Gráfica de respuesta obtenida (absorbancia) en función de la concentración de sulfametoxazol, los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de seis determinaciones

## 5.PRECISION Y EXACTITUD INTRADIA

Los datos presentados en la tabla VI fueron utilizados para obtener la precisión y exactitud intradía:

CONCENTRACION TEORICA DE SULFAMETOXAZOL (µg/ml)	CONCENTRACION EXPERIMENTAL DE SULFAMETOXAZOL (µg/ml)	%C.V. DE LA CONC. EXPERIMENTAL	EXACTITUD % RECObRO	% C.V.
8	8.14	1.4353	101.77	1.4650
8	8.15		101.91	
8	8.05		100.62	
8	8.02		100.29	
8	8.20		102.53	
8	7.88		98.44	
18	17.86	0.4348	99.21	0.4517
18	18.09		100.55	
18	17.98		99.90	
18	17.93		99.63	
18	18.02		100.11	
18	17.97		99.81	
24	23.93	0.3220	99.71	0.2109
24	24.04		99.83	
24	24.02		100.01	
24	24.13		99.87	
24	24.14		99.47	
24	24.04		100.04	
36	36.08	0.2574	100.21	0.5725
36	36.11		99.44	
36	36.33		100.90	
36	36.17		99.83	
36	36.26		99.67	
36	36.19		99.38	

Tabla VI. Resultados obtenidos para evaluar la precisión y exactitud intradía por medio del porcentaje de recobro y su respectivo porcentaje del coeficiente de variación para cada concentración utilizada

## 6. PRECISION Y EXACTITUD INTERDIAS

En la tabla VII se presentan los datos obtenidos y utilizados para la precisión interdiás:

DIA	EXACTITUD CONC.(8µg/ml) %RECOBRO	EXACTITUD CONC.(18µg/ml) %RECOBRO	EXACTITUD CONC.(24µg/ml) %RECOBRO	EXACTITUD CONC.(36µg/ml) %RECOBRO
1	101.77	99.21	99.71	100.21
	101.91	100.55	99.83	99.44
	100.62	99.90	100.01	100.90
	100.29	99.63	99.87	99.83
	102.53	100.11	99.47	99.67
	98.44	99.81	100.04	99.38
2	99.78	99.85	99.72	100.25
	102.72	100.25	99.91	99.89
	99.96	99.24	99.53	99.54
	101.69	9.78	100.57	100.54
	102.19	99.50	99.89	100.78
	100.25	101.22	100.04	99.53
3	99.56	100.53	100.11	100.39
	98.42	99.50	99.84	99.87
	100.07	100.17	100.32	98.45
	100.10	100.76	99.97	99.76
	99.97	99.46	99.46	99.45
	99.76	99.98	100.03	100.65

Tabla VII. Resultados obtenidos de los porcentos de recobro en las diferentes concentraciones utilizadas en tres días de experimentación

En la tabla VIII se muestran los promedios obtenidos para el coeficiente de variación en cada una de las concentraciones utilizadas (con cálculos de acuerdo al anexo II):

DIA	CONC.(8µg/ml) %C.V.	CONC.(18µg/ml) %C.V.	CONC.(24µg/ml) %C.V.	CONC.(36µg/ml) %C.V.
1	1.4650	0.4517	0.2109	0.5725
2	1.2453	0.6995	0.3542	0.5211
3	0.6369	0.5293	0.2904	0.7782

Tabla VIII. Resultados obtenidos del porcentaje del coeficiente de variación para cada una de las concentraciones utilizadas en tres días diferentes en base a los datos de la tabla VII



## 7.PERFIL DE CONCENTRACION PLASMATICA VS TIEMPO

En la tabla IX se presentan los resultados obtenidos de un estudio farmacocinético del sulfametoxazol en ratas Wistar macho para determinar la aplicación del método:

T (h)	RATA 1	RATA 2	RATA 3
0	0	0	0
0.5	0.202	0.199	0.212
1.0	0.254	0.265	0.241
1.5	0.294	0.296	0.296
2.0	0.325	0.322	0.326
2.5	0.386	0.374	0.352
3.0	0.401	0.406	0.407
3.5	0.427	0.436	0.432
4.0	0.438	0.442	0.452
5.0	0.482	0.472	0.476
7.0	0.501	0.506	0.509
9.0	0.557	0.556	0.553
12.0	0.352	0.361	0.364
13.0	0.322	0.318	0.320
14.0	0.291	0.281	0.294
15.0	0.221	0.219	0.225

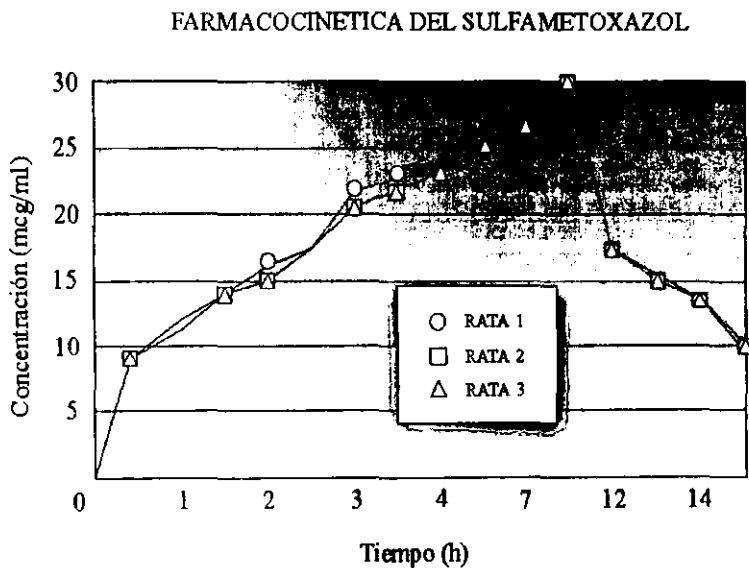
Tabla IX. Aquí se muestran los diferentes tiempos de muestreo así como las absorbancias obtenidas en un estudio farmacocinético de sulfametoxazol

Los datos presentados en la tabla X representan las concentraciones interpoladas a partir de los datos de la IX:

T (h)	CONC.( $\mu\text{g/ml}$ ) RATA 1	CONC.( $\mu\text{g/ml}$ ) RATA 2	CONC.( $\mu\text{g/ml}$ ) RATA 3
0	0	0	0
0.5	8.35	8.17	8.96
1.0	11.50	12.18	10.72
1.5	13.94	14.06	14.06
2.0	15.83	15.64	15.89
2.5	19.53	18.80	17.47
3.0	20.45	20.75	20.81
3.5	22.02	22.57	22.33
4.0	22.69	22.93	23.55
5.0	25.37	24.76	25.00
7.0	26.53	26.83	27.01
9.0	29.93	29.87	29.69
12.0	17.47	18.01	18.19
13.0	15.64	15.40	15.52
14.0	13.75	13.15	13.94
15.0	9.50	9.38	9.74

Tabla X. Datos que representan las concentraciones interpoladas obtenidas en ( $\mu\text{g/ml}$ ) a partir de las absorbancias de la tabla IX con la curva patrón respectiva

Al graficar concentración vs tiempo (datos de la tabla X) se obtiene la gráfica III, en donde se observa la farmacocinética del sulfametoxazol:



**Gráfica III.** En esta gráfica se observa la etapa de absorción y eliminación del sulfametoxazol, en un estudio realizado en ratas Wistar macho de entre 200-250 g

# ANALISIS DE RESULTADOS

Antes de iniciar la implementación del método se hizo necesario determinar la calidad de la materia prima (sulfametoxazol) disponible en la planta Piloto Farmacéutica Campo II, para lo cual se realizó el análisis de la materia prima de acuerdo a los requerimientos que marcaba la FEUM en su 7ª edición. Los datos presentados en la tabla I confirman que todas las pruebas realizadas estuvieron dentro de especificaciones incluyendo la valoración del sulfametoxazol la cual fue de 101.07%, concluyendo de esta manera que los resultados fueron satisfactorios y que el activo cumple con las especificaciones requeridas y puede ser empleado con seguridad para los siguientes ensayos.

La decisión de utilizar la técnica descrita en el diagrama 3, utilizada para cuantificar sulfametoxazol en sangre estuvo basada en el hecho de que en la búsqueda bibliográfica realizada se encontró que esta técnica era la más viable para la cuantificación de la sustancia de interés en el laboratorio, debido a que los reactivos utilizados son económicos y fáciles de conseguir además de ser específico aún en una matriz biológica; por otro lado cuando se hicieron las pruebas necesarias la técnica arrojó resultados confiables al utilizar micromuestras de sangre (100µl) demostrando ser la más sensible, comparada con otras técnicas encontradas en la bibliografía y que también cuantifican sulfametoxazol.

La validación del método se siguió con base a la referencia Shah (1992), la cual indica los parámetros a seguir para validar un método analítico utilizado para estudios de biodisponibilidad. Así, el primer parámetro evaluado fue la especificidad, en donde al analizar la gráfica I que

corresponde a los resultados obtenidos para este parámetro (espectro de la reacción) se observa que este método solamente cuantifica al sulfametoxazol, ya que en la reacción del sulfametoxazol en sangre se obtuvo una sola respuesta a 540nm en la región visible debido a la formación de un compuesto diazo y donde matrices independientes de sangre de rata no presentan productos endógenos que puedan interferir en la formación del compuesto diazo; por lo que se infiere que el método analítico tiene la habilidad de medir a la sustancia de interés (sulfametoxazol), es decir, que es específico en el medio en el que se determino.

Sin embargo es necesario aclarar que este método no podría ser aplicado cuando se tenga conocimiento de la presencia de una sustancia que contenga el grupo funcional amino, ya que este es el grupo por medio del cual lleva a cabo la reacción de diazoación con el ácido nitroso y posteriormente la copulación con el N-1(naftil)etilendiamina hidrociorado produciendo el compuesto diazoico de color, llevando esto a una errónea cuantificación de la sustancia de interés.

En las tablas II y III se observan los resultados obtenidos para la estabilidad de la muestra y donde: para la concentración de 14 $\mu$ g/ml por 24hrs. a -2°C dió un IC =(-0.12 a 1.479) y un I=100.79%, para las 48 hrs. a -2°C un IC =(-0.859 a 0.499) y un I=99.821%, y para las 72 hrs. a -2°C un IC =(-0.4381 a 1.9419) y un I=98.81%. Por otro lado para la estabilidad de la muestra a la concentración de 26 $\mu$ g/ml 24 hrs. a -2°C se obtuvo un IC =(-0.2437 a 0.7237) y un I= 100.25%, para las 48 hrs. a -2°C dió un IC =(-0.3679 a 0.5279) y un I= 100.08% y para las 72 hrs. a -2°C un IC =(-0.7037 a 0.0237) con un I=99.67%. Los resultados

obtenidos indican que las muestras sometidas a estas condiciones de almacenamiento son estables, ya que los intervalos de confianza obtenidos incluyen el valor de cero y en las medias de los I los porcentajes están dentro de los límites establecidos para métodos espectrofotométricos que son del 97-103%.

Los resultados obtenidos para el parámetro concentración-respuesta se presentan en las tablas IV y V y en la gráfica II, estos resultados muestran la asociación lineal directa entre las variables absorbancia y concentración del tipo  $y = a + bx$  donde el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) fue de 0.9992 y la ecuación obtenida por mínimos cuadrados que mejor describió esta relación fue  $y = 0.0639 + 0.0165x$  donde el valor a la ordenada al origen no fue significativamente diferente a cero (con cálculos de acuerdo al anexo III), por lo cual se infiere que este método es lineal en el rango de concentraciones de 8-38 $\mu\text{g/ml}$ .

Los resultados obtenidos para la exactitud y precisión intradía se encuentran reportados en la tabla VI donde: para la concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$  dio un C.V.=1.4650%, para 18 $\mu\text{g/ml}$  un C.V.=0.4517%, para 24 $\mu\text{g/ml}$  un C.V.=0.2109% y para 36 $\mu\text{g/ml}$  un C.V.=0.5725%, siendo el máximo permitido del 15%, lo que indica que este método es preciso y exacto en repeticiones que se realicen en un mismo día de experimentación.

Los resultados para la precisión y exactitud interdía se encuentran reportadas en las tablas VII y VIII y como se puede observar se realizó en tres días de experimentación, para el día I se obtuvieron los siguientes resultados: para la concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$  un C.V.=1.4650%, para 18 $\mu\text{g/ml}$  un C.V.=0.4517%, para 24 $\mu\text{g/ml}$  un C.V.=0.2109% y para 36 $\mu\text{g/ml}$  un

C.V=0.5725%, para el día 2 los resultados fueron: para la concentración de  $8\mu\text{g/ml}$  un C.V= 1.2453%, para  $18\mu\text{g/ml}$  un C.V=0.6995%, para  $24\mu\text{g/ml}$  un C.V=0.3542% y para  $36\mu\text{g/ml}$  un C.V=0.5211% y para el día 3 se obtuvo que: para la concentración de  $8\mu\text{g/ml}$  dio un C.V=0.6369%, para  $18\mu\text{g/ml}$  un C.V=0.5293%, para  $24\mu\text{g/ml}$  un C.V=0.2904% y para  $36\mu\text{g/ml}$  un C.V=0.7782%, siendo el máximo permitido del 15%; con lo cual se concluye que el método es preciso y exacto en repeticiones que se realicen en diferentes días de experimentación.

Para demostrar la utilidad del método en estudios de biodisponibilidad y farmacocinética se utilizaron muestras sanguíneas de ratas wistar macho de cerca de  $100\mu\text{l}$ , tratadas con  $1\text{g/kg}$  peso de sulfametoxazol por vía oral, en la gráfica III se presenta el perfil de los niveles de sulfametoxazol en sangre total en las tres ratas durante las 15 hrs posteriores a la administración del fármaco, con estos datos se lograron obtener los parámetros farmacocinéticos: tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ), ABC,  $C_{p_{\text{max}}}$  y  $t_{\text{max}}$ , dando los siguientes resultados: 9.1929hrs,  $433.84\mu\text{g/ml}$ ,  $29.93\mu\text{g/ml}$  y 9.0hrs respectivamente, datos que se acercan mucho a lo reportado en la bibliografía (en base a la información del anexo IV).

## CONCLUSIONES

La validación es la única forma de garantizar que un método analítico utilizado es seguro y eficaz, a pesar de que éste no sea el más moderno como puede llegar a suceder con los métodos espectrofotométricos, pero ya que estos se sustentan en parámetros y herramientas estadísticas adecuadas, al realizar la validación dan la evidencia de que el método cumple con las especificaciones establecidas.

La técnica analítica utilizada para cuantificar sulfametoxazol en sangre de rata es específica, precisa, exacta en el rango de 8-38 $\mu$ g/ml y tiene una estabilidad de la muestra de tres días, por lo que puede ser empleada para obtener resultados confiables y seguros aplicables a estudios de farmacocinética y biodisponibilidad.

## **SUGERENCIAS**

Para posteriores investigaciones se recomienda utilizar la presente técnica para cuantificar el sulfametoxazol acetilado, ya que una parte del sulfametoxazol se biotransforma en el hígado acetilándose y éste necesita un tratamiento especial para que pueda ser cuantificado por medio de esta técnica y así obtener el sulfametoxazol total.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



# ANEXOS

## ANEXO I

### Estabilidad de la muestra:

#### CONDICION/TIEMPO

INICIAL	1	2	3
$Y_1$	$Y_4$	$Y_7$	$Y_{n-2}$
$Y_2$	$Y_5$	$Y_8$	$Y_{n-1}$
$Y_3$	$Y_6$	$Y_9$	$Y_n$

### Cálculos preliminares para el intervalo de confianza:

MEDIA	$Y_0$	$Y_1$	$Y_2$	$Y_M$
VARIANZA	$S_0^2$	$S_1^2$	$S_2^2$	$S_m^2$

#### VARIANZAS PONDERADAS

$$Sp_1^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_1^2}{2(c+1)}$$

$$Sp_2^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_2^2}{2(c+1)}$$

$$Sp_m^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_m^2}{2(c+1)}$$

### Cálculos finales para el intervalo de confianza:

$$IC = (Y_1 - Y_0) \pm t^* \times \sqrt{Sp_1^2 (2/3)}$$

Donde:

t\*=valor de la t de Dunnett con c comparaciones y 2 (c+1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

## **ANEXO II**

Coefficiente de variación (CV)

$$CV = S / X \times 100$$

donde:

S= desviación estándar de la muestra

X= media de la muestra

## **ANEXO III**

Cálculo de la ordenada al origen:

$$A = \frac{\sum y \sum x^2 - \sum x \sum xy}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Cálculo de la pendiente:

$$B = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Cálculo del error típico de estimación modificado:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2}}$$

### **Evaluación de la ordenada al origen**

Hipótesis planteada:

$$H_0: A = 0$$

$$H_1: A \neq 0$$

Estadígrafo de contraste "t" Student

# BIBLIOGRAFIA

1. Ylla, C.M; "Validación de procesos en la industria farmacéutica", Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; 1995, 10 (4):17-23
2. Lual, M. C; "Componentes para un programa de validación de métodos analíticos", Pharma News; 1993, 173 (7):16-22
3. Baron, A; Garzon, A; "Desarrollo y validación de un método indicativo de estabilidad por espectrofotometría", Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; 1991, 22 (2):31-36
4. Inman, E. L; Fishman, J. K; "General Methods Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples", J. Chr. Sci; 1987, 25:252-256
5. Guerra, J; Finkelson, M. J; "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories", Anal. Chem; 1986, 14: 82-86
6. Taylor, J. K; "Validation of Analytical Methods", Anal. Chem; 1983, 55: 601A-608A
7. Gonigle, M. C; "Analytical Methods Validation", Chemical Institute of Canada; 1988, 18: 211-215
8. Shah, V. P; et al; "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies", J. Pham. Sci; 1992, 81 (3):309-312
9. Smith, R. V; Stewart, J. T; "Textbook of Biopharmaceutic Analysis", Ed. Lea and Febiger, Filadelfia, 1981, 10, 23-25
10. Valdés, R. J; "Ventajas y Limitaciones de los Diferentes Métodos Analíticos", Pharma News; 1990, 185 (4):28-32

- 11.**Smith, C; "Farmacología", 15°ed.; Ed. Reverté, Barcelona, España; 1990, pag. 802
- 12.**Goth, A; "Farmacología Medica", 9°ed.; Ed. Mosby Company, España; 1985, pag. 710-715
- 13.**Lawrence, M; Papadakis, M; "Diagnóstico Clínico y Tratamiento", Ed. El Manual Moderno, México; 1997, pag. 1369-1371
- 14.**Katzung, B; "Farmacología Básica y Clínica" 2°ed.; Ed. El Manual Moderno, México; 1986, pag. 164-166
- 15.**Serill, L; "Bases Farmacológicas de la Terapéutica Medicamentosa", Ed. Salvat, España; 1988, pag.127
- 16.**Goodman, L, S; Gilman, A. G; "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica" 9°ed.; Ed. Panamericana, 1990; pag. 594-595
- 17.**Craig, Ch; Stitzel, R; "Farmacología Médica", Ed. Interamericana, México, 1991; pag. 285-287
- 18.**Bowman, W. C; Rand, M. S; "Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas" 2°ed.; Ed. Interamericana, México, 1989; pag. 185-187
- 19.**Goldstein, A; Lewis, A; "Farmacología" 2°ed.; Ed. Limusa, México, 1985; pag. 624-626
- 20.**Prieto, S; Amich, S; "Laboratorio Clínico", Ed. Interamericana-Mc-Graw-Hill, México, 1993; pag. 322-340
- 21.**Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 7° ed.; Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, México, 1988, pag. 913-914

- 22.**Klaus, F; "Analytical Profiles of Drug Substances" Vol.2, Ed. Academic Press, Inc, Londres, 1984, pag. 467-485
- 23.**Dick, J, G; "Analytical Chemistry", Ed. Mc-Graw-Hill, New York, U.S.A., 1980, pag. 82-87
- 24.**Skoog, W; "Análisis Instrumental" 4ºed.; Ed. Interamericana, México, 1986; pag. 102-104
- 25.**Day; R. A; Underwood, A. L; "Química analítica cuantitativa" 5ºed., Ed. Prentice-Hall, E.U.A, 1986; pag. 93-96
- 26.**Vogel, I, A; "Química analítica cuantitativa" Vol.I, 5ºed.; Ed. Kapeluz, España; 1986; pag. 106-109
- 27.**Fisher, B, R; Dennis, G, P; "Análisis Químico Cuantitativo", Ed. Interamericana, México, 1982; pag. 189-191
- 28.**Orozco, D. F; "Análisis Químico Cuantitativo" 16ºed.; Ed. Porrúa, México, 1985; pag. 191-193
- 29.**Flaschka, H. A; "Química Analítica Cuantitativa" Vol I, Ed. Continental, México, 1982; pag. 18-22