



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN
MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
RESOLUCIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE DOXICICLINA EN PLASMA EN HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

HIRAI MIZRE GÓMEZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: HELGI HELEN JUNG COOK
VOCAL: SOFÍA MARGARITA RODRÍGUEZ ALVARADO
SECRETARIO: LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ
1ER SUPLENTE: MARÍA DE LOURDES MAYET CRUZ
2DO SUPLENTE: LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA ANALÍTICA DEL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA Y BIOTECNOLÓGICA, CIFBIOTEC
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

ASESOR DEL TEMA:

LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ_____

SUSTENTANTE:

HIRAI MIZRE GÓMEZ MARTÍNEZ_____



AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia tan linda que siempre esta ahí cuando la necesite, por toda su comprensión, amistad, paciencia, enseñanzas, que es uno de mis alicientes para estar aquí. Los quiero mucho.

Quiero dar las gracias a todos mis amigos, saben que siempre van a poder contar conmigo no importa la adversidad a la que nos enfrentemos, ni la distancia que nos separe.

A Yaz, que me conocen de tanto tiempo, o mejor dicho me ha soportado desde hace mucho, y se que aunque tomemos caminos diferentes siempre estaremos pendientes la una para la otra.

A mis amigas del CCH, Dulce Alicia, Erika Haydeé, por permitirme conocerlas, son importantes en mi vida.

A mis amigos Fernando y Vanessa, por ser mis amigos y confidentes, por los buenos consejos, por las largas pláticas, y sobre todo por compartir conmigo estos 5 años.

A Karen, Ode, Alma R (Quality Girs), que son como mis hermanas, espero que siempre seamos amigas.



AGRADECIMIENTOS



A mis grandes amigos del instituto a Martha, Diana, Almita, César, gracias por compartir conmigo tantas cosas.

A mis amigos de la Universidad, Omar Daniel, Daniel, Oscar, Jonathan, Manolo, Andy, Faby, Janet, Fernanda, Jaquie, por estos maravillosos años, espero que sigamos en contacto.

A Estela, Rosa, espero que siempre sigamos siendo amigas.

*A todos ustedes quiero dedicarles el siguiente pensamiento:
¿Qué tiene la amistad que hace mucho más enriquecedor estar
entre amigos que entre los desconocidos más cultos e
interesantes?*

Sandy Sheehy, Connecting (morrow)



A la UNAM, por permitirme ser parte de ella, por haberme dado mi segundo hogar.

A la facultad de Química, gracias a esta institución la cual me brindo el conocimiento necesario para poder llegar donde estoy, gracias por estos años en los cuales conocí amigos y profesores el cual me brindaron su confianza y enseñanza para lograr obtener una carrera.



AGRADECIMIENTOS



Quiero dar un muy reconocido agradecimiento a mi asesor M. en C. Misael del Rivero Ramírez, por su amistad, paciencia, confianza, consejos, enseñanzas y apoyo brindado este tiempo.

A los profesores Helgi Helen Jung Cook, Sofía Margarita Rodríguez Alvarado, María de Lourdes Mayet Cruz, Luis Jesús García Aguirre, por su valiosa ayuda, tiempo, apoyo, enseñanzas, y los consejos recibidos.

A todos los del CIF-BIOTEC, Itxel, Carmelita, Mimi, Oscar, por darme su comprensión, enseñanzas, tiempo y apoyo, gracias por compartir eso conmigo.

Al Dr. Jorge Luis Poo R., por todo el apoyo brindado y por permitirme formar parte de su grupo de investigación en el CIF-BIOTEC. Mi agradecimiento infinito a usted y a todos los que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

A todos aquellos que no he mencionado en esta tesis, pero de alguna forma son parte de mi vida les estoy muy agradecida.

¡A todos ustedes, gracias!

Hirai Mizre



*“El genio es un uno por ciento de inspiración y
un noventa y nueve por ciento de trabajo”.*

Thomas Alva Edison,

Escritor estadounidense (1847 - 1931)

*“La inteligencia no es una herramienta, sino una
mano capaz de usar con provecho cualquier
herramienta de la que se trate”.*

Thomas Carlyle,

Filósofo británico (1795 – 1881)



ÍNDICE GENERAL



ÍNDICE DE CUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ABREVIATURAS EMPLEADAS	IV
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO 2	
GENERALIDADES.....	4
ANTIBIÓTICOS	6
Clasificación y mecanismo de acción.....	6
TETRACICLINAS	9
Estructura química.....	10
DOXICICLINA	13
Orígenes.....	14
Identificación química.....	14
Propiedades Fisicoquímicas.....	16
Farmacocinética.....	17
Mecanismo de acción.....	18
Resistencia Bacteriana.....	19
Espectro Antimicrobiano.....	19
Usos Terapéuticos.....	20
Interacciones de la Doxiciclina con medicamentos y Alimentos.....	21
Efectos adversos y contraindicaciones.....	22



ÍNDICE GENERAL



Medicamentos genéricos intercambiables para	
Doxiciclina.....	27
Métodos bioanalíticos para la cuantificación de la	
Doxiciclina en fluidos Biológicos.....	28
CAPÍTULO 3	
PARTE EXPERIMENTAL.....	29
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	47
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65



ÍNDICE DE CUADROS



Cuadro 1.	Clasificación de los antimicrobianos.....	7
Cuadro 2.	Grupos químicos de la identificación de la tetraciclina.....	11
Cuadro 3.	Principales componentes del grupo de las tetraciclinas según su descubrimiento.....	11
Cuadro 4.	Descripción de la Doxiciclina.....	15
Cuadro 5.	Propiedades Fisicoquímicas de Doxiciclina.....	16
Cuadro 6.	Propiedades farmacocinéticas de la Doxiciclina.....	17
Cuadro 7.	Interacciones de la Doxiciclina.....	21
Cuadro 8.	Acción que tienen los alimentos cuando se administran con Doxiciclina.....	22
Cuadro 9	Medicamentos genéricos intercambiables que contienen Doxiciclina.....	27
Cuadro 10.	Métodos analíticos en fluidos biológicos para cuantificar Doxiciclina.....	28
Cuadro 11.	Curva estándar y muestras control propuestas inicialmente.....	32
Cuadro 12 a.	Preparación de la curva estándar intervalo 0.196 a 2 µg/mL y muestras control de DCX en plasma.....	39
Cuadro 12 b.	Muestras control de DCX en plasma.....	39
Cuadro 13.	Linealidad del método analítico en el intervalo de 0.196 a 2.0 µg/mL para cuantificar DCX en plasma humano.....	51
Cuadro 14.	Precisión y exactitud (Repetibilidad) del método analítico para cuantificar DCX en plasma.....	53
Cuadro 14 a.	Precisión y exactitud (Reproducibilidad intra-analista) del método analítico para cuantificar DCX en plasma.....	54
Cuadro 14 b.	Precisión y exactitud (Reproducibilidad inter-analista) del método analítico para cuantificar DCX en plasma.....	54
Cuadro 15.	Recobro del método analítico para cuantificar DCX en plasma.....	55



ÍNDICE DE CUADROS



Cuadro 16.	Límite de cuantificación del método analítico para cuantificar DCX en plasma.....	56
Cuadro 17.	Límite de detección del método analítico para cuantificar DCX plasma.....	56
Cuadro 18.	Selectividad del método analítico para cuantificar DCX en plasma.....	57
Cuadro 19.	Estabilidad a temperatura ambiente del DCX en plasma humano.....	59
Cuadro 20.	Estabilidad en el automuestreador del DCX en ácido perclórico al 10 %.....	59
Cuadro 21.	Estabilidad a ciclos de congelación y descongelación del DCX en plasma humano.....	60
Cuadro 22.	Estabilidad bajo condiciones del almacenamiento del DCX a -70 °C en plasma humano.....	60
Cuadro 23.	Tolerancia del método analítico a cambios de temperatura de la columna....	61
Cuadro 24.	Tolerancia del método analítico a cambios de la proporción de la Fase Móvil.....	61



ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1.	Esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, conjuntamente con algunos ejemplos de antimicrobianos que actúan a esos niveles.....	8
Figura.2.	Fórmula estructural de las Tetraciclinas.....	10
Figura 3.	Doxiciclina.....	14
Figura 4.	Mecanismo de acción de la Doxiciclina.....	18
Figura 5	Diagrama de flujo del método de extracción de DCX en plasma.....	40
Figura 6.	Barrido espectral de la doxicilina.....	49
Figura 7.	Barrido espectral de la doxicilina de 220 a 300nm.....	50
Figura 8.	Linealidad del método analítico para cuantificar Doxiciclina en plasma humano.....	52
Figura 9.	Selectividad del método para cuantificar Doxiciclina en plasma.....	58
Figura 10.	Gráfica de Concentración plasmática promedio de Doxiciclina ($\mu\text{g/mL}$) \pm EE después de la administración de los dos medicamentos. Arriba escala aritmética y Abajo escala logarítmica	63



ABREVIATURAS EMPLEADAS



\geq	Mayor o igual
\leq	Menor o igual
%	Por ciento
% v/v	Por ciento volumen en volumen
\pm	Más o menos
°C	Grados centígrados
α	Alfa
ABC	Área Bajo la Curva
ACN	Acetonitrilo
ATC	Sistema anatómico-terapéutico-químico
BD	Biodisponibilidad
C.A.S. número	Chemical Abstracts Service
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
C_{max}	Concentración Máxima
CMC	Concentración mínima cuantificable
CTR	Clortetraciclina
CV	Coefficiente de variación
DEA	Por ciento de desviación estándar absoluta
DCX	Hiclato de Doxiciclina
DMCH	Demeclociclina.
FDA	(Food and Drug Administration
g	Gramos
h	Hora
H ₂ O	Agua
HPLC	Siglas en ingles de CLAR (High Performance Liquid Chromatography)
IS	Estándar interno
L	Litro
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
Log P	Logaritmo del Coeficiente de Partición
M	Molar
MB	Matriz biológica
MC	Muestra control
MCA	Muestra control alta (1.837 $\mu\text{g/mL}$)
MCB	Muestra control baja (0.244 $\mu\text{g/mL}$)
MCM	Muestra control media (0.909 $\mu\text{g/mL}$)
MeOH	Metanol
μg	Microgramos
μL	Microlitros



ABREVIATURAS EMPLEADAS



$\mu\text{g/ mL}$	microgramo por mililitro
μm	Micrometro
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMPs	Grupo de enzimas llamadas matriz de metaloproteinasas
NA	No Aplica
N.D.	No detectable
ND	No disponible
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXY	Oxitetraciclina
pH	Potencial de hidrógeno.
PRX	piroxicam
r	Coefficiente de correlación
s	segundos
SPE	Cartuchos de extracción en fase sólida
SSA	Secretaría de Salud
$t_{1/2}$	Tiempo de Vida Media
TCA	Ácido tricloroacético
TCC	Clorhidrato de tetraciclina
Temp	temperatura
TFA	Ácido trifluoracético
T_{max}	Tiempo Máximo de Absorción
TTR	Tetraciclina
UV	Ultravioleta
Vd	Volumen de distribución



CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN

Extraordinario es el desarrollo que dentro de las disciplinas químicas ha tenido la Bioequivalencia, lo anterior se ha debido al reconocimiento que tal área viene teniendo en las empresas farmacéuticas. Su ámbito se ha ido haciendo cada vez mas preciso; lógicamente en los centros de educación superior, también se le ha dado la importancia que la misma merece.

Explicar la aparición de la Bioequivalencia en la superficie del mundo, tiempo y espacio, es más difícil que su simple identificación con un sistema económico o una filosofía mercantil. Tal especulación supone causas y las interpretaciones de los desarrollos económico sociales se toman como hipotéticas. Sin embargo, en un escenario mundial en que las fronteras entre las clases sociales económicamente hablando, se van haciendo mas grandes, y por ende el poder adquisitivo de las clases mas desprotegidas ha ido en disminución, surge la orientación que la Industria Farmacéutica ha hecho hacia la elaboración de nuevas formulas a partir de principios activos conocidos, esto es, los denominados Medicamentos Genéricos, mismos que al reducir sus costos, permiten el acceso a tratamientos terapéuticos a un mayor numero de personas

Uno de estos medicamentos es la Doxiciclina, la cual ha adquirido gran valor a ultimas fechas dada la ayuda que presta en el tratamiento de una serie de enfermedades como son entre otras: infecciones en pacientes con diferentes formas de inmunodeficiencias, infecciones producidas por nocardia, asimismo, es utilizada en la



INTRODUCCIÓN



mellidosis y en el tratamiento de inflamaciones pélvicas sobre todo aquellas producidas por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma hominis*.

En este contexto surge la necesidad de contar con métodos de evaluación confiables, que aseguren que el medicamento genérico intercambiable posea la eficacia y seguridad en su aplicación. Un método aceptado por la Secretaria de Salud para realizar las pruebas que validen la Bioequivalencia, es mediante el uso de métodos analíticos de cromatografía de líquidos de alta resolución, el cual atiende lo relativo a la determinación de niveles plasmáticos de fármacos de uso común, considerando la interpretación del comportamiento farmacocinético y terapéutico del principio activo en estudio.



OBJETIVOS



OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y Validar un Método Analítico para la Cuantificación de Doxiciclina en plasma en humano para su aplicación en estudios de Bioequivalencia.

OBJETIVO PARTICULAR

- Demostrar la confiabilidad del método bionalítico de acuerdo a los criterios que establece la NOM-177-SSA1-1998.
- Obtener las condiciones Cromatográficas adecuadas como son: la columna, componentes y proporción de la fase móvil, efectos del pH y temperatura, rango de concentración, técnica de extracción



CAPITULO 2:

GENERALIDADES

Se considera que dos productos farmacéuticos son Bioequivalentes, siempre y cuando cumplan con las especificaciones de los organismos especializados y reconocidos internacionalmente, esto en lo referente a la velocidad y cantidad del principio activo absorbido cuando son administrados bajo condiciones experimentales similares.

A partir de 1997, año en el cual fueron aprobadas las reformas a la Ley General de Salud, se marcaron en nuestro país nuevas pautas para el mercado de los Medicamentos Genéricos, ello ocurrió al introducir a la legislación la necesidad de la denominación genérica para su uso, comercialización y prescripción de estos, iniciando de esta manera la apertura de un mercado nuevo de medicamentos genéricos intercambiables.

Durante el mes de Junio de 1997, la Secretaria de Salud con la ayuda de un grupo de expertos, crea la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-003-SSA1-1998, Medicamentos Genéricos Intercambiables publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de Marzo de 1998. Mas tarde este documento sería sustituido por Norma Oficial Mexicana: NOM-177-SSA-1-1998, publicada en el Diario Oficial el 26 de Enero de 1999, documento en el cual se establecen las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable tomando en cuenta la comparación de la biodisponibilidad de los medicamentos (medicamento de prueba contra el medicamento de referencia).



GENERALIDADES



En la actualidad, la Secretaría de Salud lleva a cabo un programa de evaluación de medicamentos genéricos intercambiables a partir de estudios de disolución y bioequivalencia, con la única finalidad de asegurar la eficacia y seguridad en su aplicación.

Si se demuestra que la biodisponibilidad en el medicamento genérico es equivalente a la del medicamento innovador, entonces podemos considerarlos intercambiables, es decir, el medicamento genérico puede sustituir a la formulación innovadora durante el tratamiento terapéutico del paciente.

Los estudios para demostrar la biodisponibilidad, deberán ser realizados con base a lo dispuesto en la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud en lo referente a las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Durante el desarrollo de estos estudios, es administrada una dosis única del medicamento a evaluar y el parámetro de biodisponibilidad es medido mediante el análisis de los niveles sanguíneos. Considerando para el efecto las características de las curvas sanguíneas, esencialmente Área Bajo la Curva (ABC), Concentración Máxima (C_{max}), Tiempo Máximo de Absorción (T_{max}), mismos que son evaluados mediante procedimientos estadísticos.

Un estudio de biodisponibilidad debe ser el resultado de un diseño experimental, perfectamente planeado durante el cual se permita alcanzar los objetivos planteados a fin de obtener conclusiones validas y confiables



GENERALIDADES



De esta manera es necesario comentar que durante la planeación del experimento se deberán controlar los factores que presentan una ingerencia directa sobre la biodisponibilidad de los fármacos, tales como los factores fisiológicos.

ANTIBIÓTICOS

Los Antibióticos (del griego, *anti*, 'contra'; *bios*, 'vida') son sustancias producidas por diversas especies de microorganismo (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlos¹.

En la actualidad el término también se emplea para denominar compuestos sintéticos o semisintéticos. La principal categoría de antibióticos son los antibacterianos, pero se incluyen los fármacos antipalúdicos, antivirales y antiprotozoos.

Clasificación y mecanismo de acción ¹

Desde el punto de vista histórico, la clasificación más común se ha basado en la estructura química y mecanismo de acción propuesto, como lo indica el siguiente cuadro:



GENERALIDADES



Cuadro 1. Clasificación de los antimicrobianos

Antimicrobiano	Mecanismo de acción
Penicilinas y cefalosporinas (semejanza estructural). Cicloserina, vancomicina, bacitracina y antimicóticos del tipo imidazol (miconazol, ketoconazol y clotrimazol)	Compuestos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana.
Detergentes tipo polimixina y colistimetato y los antimicóticos poliénicos nistatina y anfotericina B (se ligan a esteroides de la pared del microorganismo).	Compuestos que actúan de modo indirecto en la membrana celular del microorganismo, afectando su permeabilidad y permiten la fuga de compuestos intracelulares
Cloranfenicol, Tetraciclinas, Eritromicinas y Clindamicina	Compuestos que afectan la función de las subunidades ribosómicas 30S ó 50S y causan inhibición reversible de la síntesis proteínica (son bacteriostáticos)
Aminoglucósidos	Compuestos que se unen a la subunidad ribosómica 30S y alteran la síntesis de proteínas, lo cual acaba con la muerte del microorganismo (Bactericida).
Rifampicina (bloquean a la RNA polimerasa dependiente de DNA) Quinolonas (inhiben a la girasa).	Compuestos que afectan el metabolismo de ácido nucleico.
Trimetoprim y Sulfonamidas	Antimetabolitos, bloquean las fases metabólicas específicas que son esenciales para los microorganismos.
Zidovudina, Ganciclovir, Vidarabina y Aciclovir	Análogos de ácidos nucleicos, los cuales bloquean a las enzimas virales que son esenciales para la síntesis de DNA y así impiden la réplica viral.

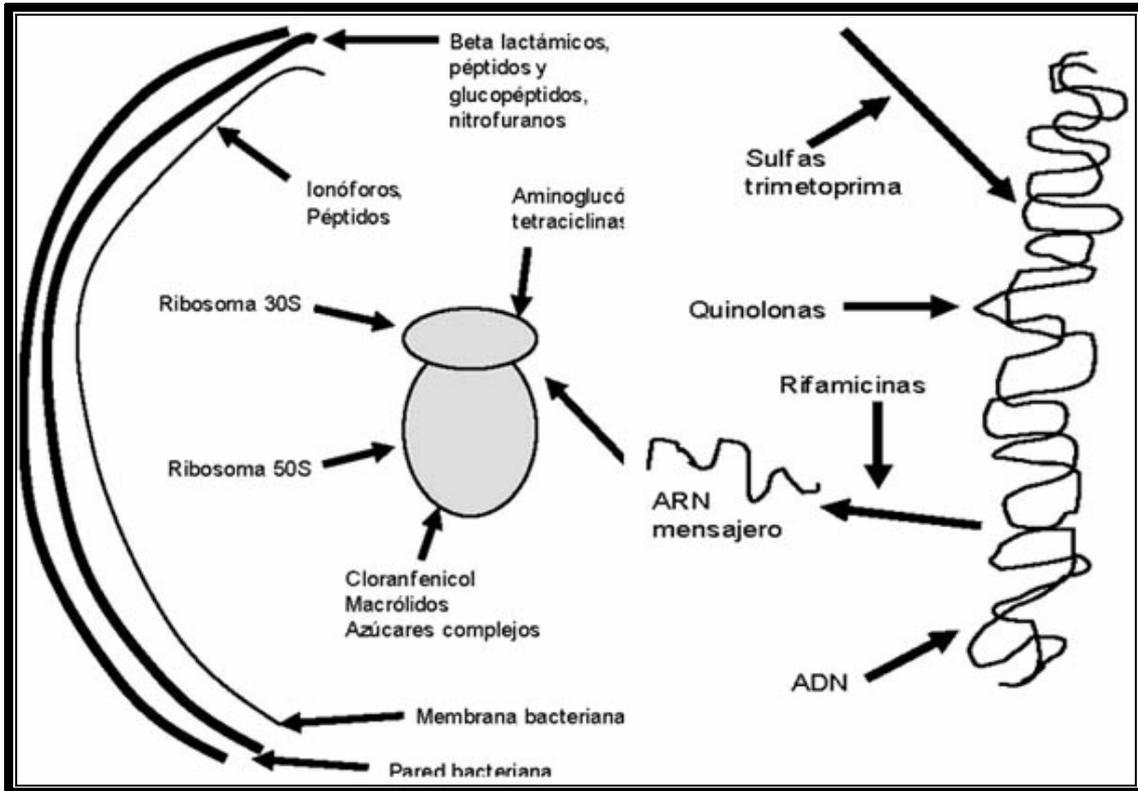


Figura 1. Esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, conjuntamente con algunos ejemplos de antimicrobianos que actúan a esos niveles ².



GENERALIDADES



TETRACICLINAS³

Como resultado de una intensa búsqueda de antibióticos en muestras de suelos, *Duggar* descubrió en 1948, a partir de un cultivo de *Streptomyces aureofaciens*, la primera tetraciclina, esto es, la clorotetraciclina (aureomicina). Posteriormente, a partir de un mutante de esta se obtuvo la demeclociclina.

Dos años después (1950), *Finlay* y otros aislaron de un cultivo de *Streptomyces rimosus*, la oxitetraciclina (terramicina) y más adelante (1953) *Minieri* y otros obtuvieron la tetraciclina base a partir de cepas de *Streptomyces alboniger* o *texasi*.

Estas tetraciclinas naturales, obtenidas a partir de cepas de *Streptomyces*, son las tetraciclinas de primera generación.

Una serie de nuevos compuestos semisintéticos obtenidos a partir de los anteriores, presentan mayor liposolubilidad y vida media, así como mejor absorción intestinal, estos son clasificados como tetraciclinas de segunda generación. Entre las cuales se encuentran la minociclina y la doxiciclina, siendo ésta la más utilizada actualmente en medicina humana, además de ser la menos toxica, tener un costo y mejores propiedades farmacocinéticas.

Por último, los más recientes y potentes componentes de esta familia, las glicilciclinas (tigeciclina), son consideradas las tetraciclinas de tercera generación.



GENERALIDADES



Este grupo de antibióticos tiene un espectro microbiológico muy amplio, las cuales actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas.

Estructura química

Todas poseen un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos hidronaftaceno fusionados con carácter anfotérico (Fig. 2). La suma de diferentes grupos funcionales ha dado lugar a numerosos compuestos que pueden agruparse en tres generaciones según el orden de su descubrimiento (cuadro 3). Las glicilciclinas constituyeron la última generación de tetraciclinas descubiertas tras modificar la posición 9 del anillo tetracíclico. La tigeciclina es el principal representante y se encuentra en fase experimental.

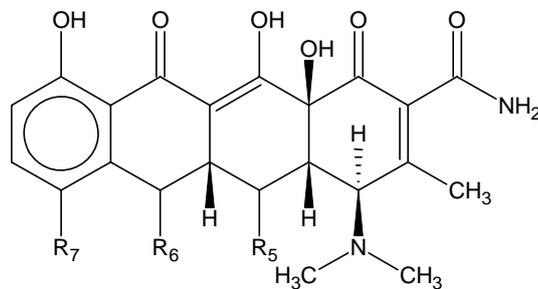


Figura 2. Fórmula estructural de las Tetraciclinas



GENERALIDADES



Cuadro 2. Grupos químicos de la identificación de la tetraciclina.

Tetraciclina	Grupo R5	Grupo R6	Grupo R7
Doxiciclina	–OH	–CH ₃	–H
Oxitetraciclina	–OH	–CH ₃ ; –OH	–H
Clortetraciclina	–H	–CH ₃ ; –OH	Cl del –
Tetraciclina	–H	–CH ₃ ; –OH	–H
Metaciclina	–OH	–CH ₂	–H
Minociclina	–H	–H	–N(CH ₃) ₂
Demeclociclina	–H	–OH	Cl del –

La adición de varios grupos en R5, R6, y R7 del núcleo tetraciclínico produce derivados con diferentes grados de actividad antibacteriana, absorción gastrointestinal y unión a proteínas plasmáticas.

Cuadro 3. Principales componentes del grupo de las tetraciclinas según su descubrimiento⁴

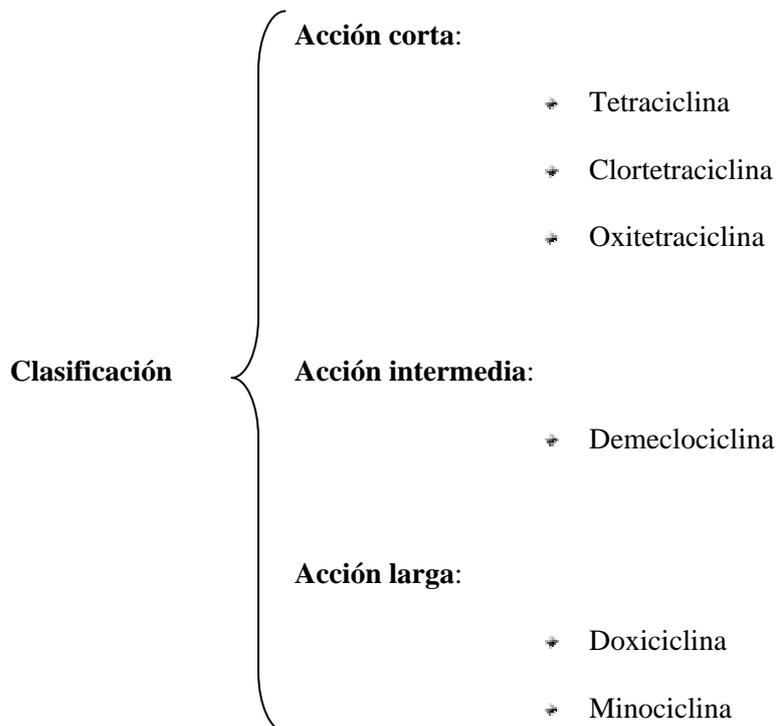
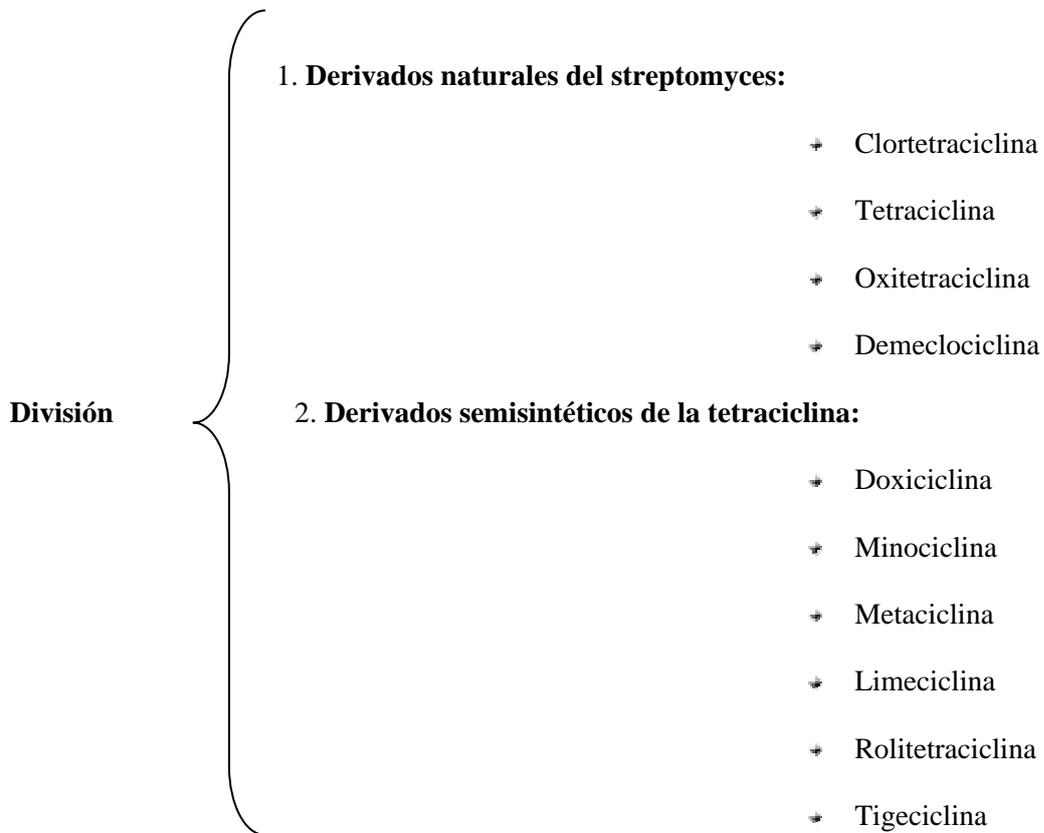
Generación	Nombre genérico	
Primera (1948-1963)	Clortetraciclina Oxitetraciclina	Producidas por dos diferentes especies de <i>Streptomyces</i> ; descubiertas a finales de los años 1940
	Tetraciclina Demeclociclina	Obtenidas a partir de <i>Streptomyces</i> en la década de 1950
	Rolitetraciclina Limeciclina Clomociclina	Derivados semisintéticos caracterizados por su hidrosolubilidad
Segunda (1965-1972)	Metaciclina Doxiciclina Minociclina	Derivados semisintéticos de las primeras
Tercera (1993-)	Glicilciclinas (tigeciclina)	El grupo más recientemente descrito; en fase experimental



GENERALIDADES



Las **Tetraciclinas** se dividen y clasifican en:





GENERALIDADES



DOXICICLINA⁵

Es un derivado semisintético de la tetraciclina aislada en 1966. Se absorbe por vía oral en forma adecuada, con una vida media de eliminación de 17 a 20 horas, aunque ésta puede acortarse a 7 horas aproximadamente en los pacientes que reciben tratamiento crónico con barbitúricos o fenitoína.

Este medicamento ha adquirido gran valor en este último decenio, en relación con la ayuda que presta en el tratamiento de infecciones oportunistas en pacientes con diferentes formas de inmunodeficiencias. Es de utilidad en las infecciones producidas por nocardia. Se ha utilizado en la mellidosis y es un arma potente en las manos de ginecólogos cuando las prescriben para las inflamaciones pélvicas sobre todo aquellas producidas por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma hominis*.

En el cólera, está demostrado su uso en dosis única, así como para brindar profilaxis a sujetos expuestos en áreas epidémicas a este germen. La diarrea producida por *Isospora belli*, en los pacientes con SIDA puede causarles la muerte, ésta se trata con sulfametoxazol y trimetropina, sin embargo en pacientes con alergia a las sulfas, la doxiciclina es una buena alternativa.

Al igual que sus congéneres, brinda utilidad en el tratamiento de la brucelosis y la enfermedad de Lima, así como en las fiebres causadas por rickettsias. Se ha recomendado en la prevención de la malaria, en la diarrea del viajero y como alternativa en la enfermedad del legionario.

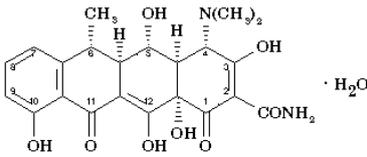
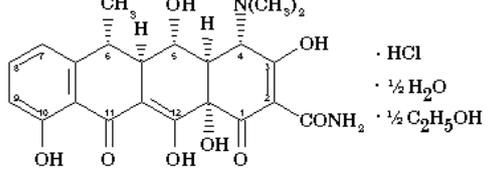


GENERALIDADES



hiclato es una sal del ácido clorhídrico solvatado con agua y el etanol, se utiliza en la formulación de cápsulas o de tabletas.

Cuadro 4. Descripción de la Doxiciclina

Nombre Químico	Monohidrato de Doxiciclina	Hiclato de doxiciclina
Estructura Química		
Conocido químico	Doxiciclina Monohidratada	Clorhidrato Hemienolato Hemihidratado o Hiclato de Doxiciclina
Fórmula molecular	$H_2O \cdot C_{22}H_{24}N_2O_8$	$C_{22}H_{25}ClN_2O_8 \cdot \frac{1}{2}C_6H_6O \cdot \frac{1}{2}H_2O$
Peso molecular	462.46	512.94
C.A.S. número	17086-28-1	24390-14-5
Nombre científico de la Doxiciclina	[4S-(4 α , 4a α , 5 α , 5a α , 6 α , 12a α)]-4-(dimetilamino)- 1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-octahidro-3,5,10,12,12a-pentahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacene carboxamida monohidratada	

Su estructura química básica consiste en un núcleo de hidronaftaceno que contiene cuatro anillos hexacíclica (el origen del nombre del tetraciclina). Las diferencias químicas entre los miembros principales de la familia de la tetraciclina están en los sustitutos de tres átomos del carbón (C5, C6 y C7).



GENERALIDADES



Propiedades Fisicoquímicas

Cuadro 5. Propiedades Fisicoquímicas de Doxiciclina^{7,8,9,10}

Descripción	Es un polvo cristalino ligeramente amarillo.
Solubilidad	Agua
Masa Molecular	444.435 g/mol
Punto de Fusión	201 °C
Solubilidad en H₂O	630 mg/L
Estado	Sólido
LogP/Hidrofobicidad	-1.219
pKa⁹	3.4, 7.7 y 9.4
Clasificación según ATC⁸	Antimalariaco Agente Antibacterial Tetraciclinas ATC:A01AB22 ATC:J01AA02



GENERALIDADES



Propiedades farmacocinéticas

Cuadro 6 Propiedades farmacocinéticas de la Doxiciclina^(10, 11, 12)

Biodisponibilidad (BD) (%)	93
Absorción	<p>La Doxiciclina se absorbe prácticamente en su integridad después de administrarse por vía oral (90-100%), es metabolizada por el hígado en la bilis, excretada en la orina y heces en elevadas concentraciones y en forma biológicamente activa.</p> <p>Los estudios reportados hasta la fecha indican que la absorción de doxiciclina no se modifica notablemente por la ingestión de comida o leche a diferencia de lo que se observa con algunas otras tetraciclinas.</p>
Unión a Proteínas (%)	88 ± 5
Distribución	<p>Llegan a todos los tejidos del organismo por su liposolubilidad. Se acumulan en el sistema retículo-endotelial.</p> <p>Pasan la placenta: 10-60% concentrándose en tejido óseo y dental fetal</p> <p>En L.C.R. alcanzan 5-25%, sin inflamación meníngea.</p>
Volumen de distribución (Vd) (L/Kg)	0.75 ± 0.32
Metabolismo	Doxiciclina se metabolizan en hígado con ácido glucurónico (50%).
Fase I Enzima Metabolizadora	CYP3A4 Citócromo P450 CYP3A4
Excreción	Excreción biliofecal tras sufrir circulación enteropática. Está presente en una forma biológica inactiva en las heces. Por lo tanto, no afecta la flora intestinal y es por lo tanto menos probable causar diarrea.
Excreción Renal (%)	41 ± 19 (Este porcentaje de excreción puede reducirse a una velocidad tan lenta como 1-5%/72 horas en individuos con insuficiencia renal severa.)
Formulación	cápsulas
Dosis (mg)	100
Cmax (µg/mL)	1.95
Tmax (h)	2.27
ABC (µg h/mL)	ND
t_{1/2} (h)	17.47



Mecanismo de acción¹

La doxiciclina es bacteriostática frente a una gran variedad de microorganismos tanto gram-positivos como gram-negativos. En las bacterias gram-negativas, el transporte del fármaco al interior de la célula tiene lugar por difusión pasiva (pórinas), pero también mediante un sistema de transporte activo ATP-dependiente. Se cree que este sistema también está presente en las bacterias gram-positivas. La doxiciclina es una tetraciclina muy lipófila, por lo que el paso al citoplasma de la bacteria es más fácil. Una vez dentro de la célula, se une a las subunidades ribósomicas 30S del ribosoma bacteriano, con lo que se bloquea la unión del aminoacil-RNA de transferencia al RNA mensajero, siendo esta unión reversible. De esta manera, las tetraciclinas bloquean la síntesis de proteínas impidiendo el desarrollo bacteriano, además de quelar el Magnesio necesario para la unión ribosómica e inhibir sistemas enzimáticos bacterianos como fosforilación oxidativa.

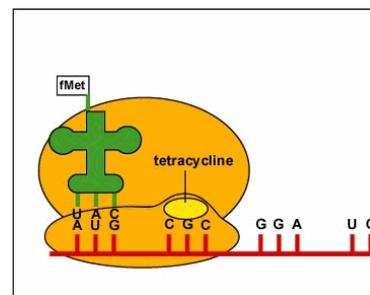
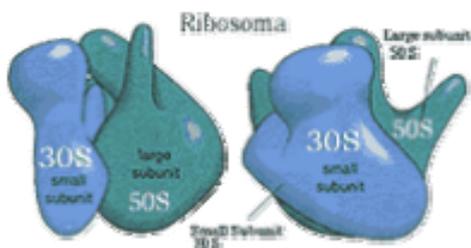


Figura 4. Mecanismo de acción de la Doxiciclina.

En dosis muy elevadas, las tetraciclinas también pueden bloquear la síntesis de proteínas en las células de los mamíferos, pero estas carecen de los sistemas de transporte activo de las bacterias.



Resistencia Bacteriana

La resistencia a las tetraciclinas puede ser natural o adquirida. La resistencia es causada generalmente por disminución de la permeabilidad por mutación de la membrana celular o un factor de resistencia inducido por plasmidos.

Otros mecanismos de resistencia son:

- Disminución de la acumulación en la célula bacteriana
- Salida activa de antibiótico desde la bacteria
- Alteración en el sitio ribosómico de unión (mutaciones en el ARN-ribosomal)

Espectro Antimicrobiano

La Doxiciclina es un antibiótico de amplio espectro, con actividad contra un amplio rango de microorganismos gramnegativos y grampositivos, incluyendo algunas anaerobias, como serían: rickettsias, clamidias, micloplasmas y formas L; y para algunos protozoarios como las amibas.

Bacterias gramnegativas:

Acinetobacter sp, Bacteroides sp, Bartonella bacilliformis, Brucella sp, Calymmatobacterium granulomatis, Campylobacter fetus, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Francisella tularensis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Klebsiella sp, Moraxella catarrhalis, Neisseria gonorrhoeae, Shigella sp, Vibrio cholerae, Yersinia pestis



GENERALIDADES



Bacterias grampositivas:

Streptococci alfa hemolítica grupos de *Enterococcus* (*S. faecalis* y *S. faecium*), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus anthracis*

Otros microorganismos:

Actinomyces sp, *Bacillus anthracis*, *Balantidium coli*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia duttonii*, *Borrelia recurrentes*, *Chlamydia psittacci*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium sp*, *Entamoeba species*, *Fusobacterium sp*, *Leptotrichia buccalis*, *Leptospira sp*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Plasmodium falciparum* (solamente las formas eritrocíticas asexuales), *Propionibacterium acnes*, *Rickettsias*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Ureaplasma urealyticum*.

Usos Terapéuticos

La Doxiciclina es el fármaco de elección en el tratamiento de la enfermedad de Lima, brucelosis e infecciones severas por rickettsia, también es empleado en el tratamiento de diversas enfermedades de transmisión sexual. En años recientes se ha incrementado el interés en su papel como inhibidor del grupo de enzimas llamadas matriz de metaloproteinasas (MMPs), las cuales están involucradas en un número de procesos patológicos tales como periodontitis, enfermedades reumáticas degenerativas y desordenes vasculares degenerativos¹³. Con base en su eficacia la FDA (Food and Drug Administration)¹⁴ lo aprueba como único inhibidor de las MMPs en terapia adjunta en la periodontitis.



GENERALIDADES



La FDA¹⁵ recomienda la Doxiciclina para el ántrax, incluyendo ántrax por inhalación (postexposición); para reducir la incidencia o progresión de la enfermedad después de la exposición a *Bacillus anthracis* en aerosol.

Interacciones de la Doxiciclina con medicamentos y Alimentos

Cuadro 7. Interacciones de la Doxiciclina¹¹

Fármaco	Efecto	Manejo
ANTICONCEPTIVOS ORALES COMBINADOS	<i>Disminuye la efectividad de los anticonceptivos</i>	<i>Usar otro método de control natal.</i>
CISATRACURIO	<i>Aumenta el bloqueo neuromuscular</i>	<i>Disminuir la dosis de cisatracurio.</i>
FENITOÍNA	<i>Disminuye la efectividad de la Doxiciclina</i>	<i>Aumentar la dosis de Doxiciclina durante tratamiento conjunto.</i>
FENOBARBITAL	<i>Disminuye la efectividad del antibiótico</i>	<i>Aumentar la dosis de doxiciclina durante tratamiento conjunto.</i>
METOTREXATO	<i>Aumenta el riesgo de toxicidad por metotrexato (leucopenia, trombocitopenia, anemia, nefrotoxicidad, úlceras de mucosas)</i>	<i>Vigilar efectos adversos de metotrexato; si es posible cambiar antibiótico.</i>
SUBSALICILATO DE BISMUTO	<i>Disminuye la efectividad del antibiótico</i>	<i>Aumentar la dosis de Doxiciclina al menos 2 a 3 horas antes del bismuto. Su combinación no se recomienda.</i>



GENERALIDADES



Cuadro 8. Acción que tienen los alimentos cuando se administran con Doxiciclina

Alimento	Efecto	Manejo
Leche o productos lácteos	<p><i>Disminución en la absorción del fármaco con reducción de su biodisponibilidad, por una posible formación de quelatos poco solubles con el calcio contenido en la leche y sus derivados.</i></p> <p><i>Los cationes divalentes o trivalentes son quelatos para los antibióticos tetraciclínicos, formando compuestos insolubles. Los efectos de las sales de calcio sobre la biodisponibilidad de la doxiciclina son menores que los de otras tetraciclinas.</i></p>	<p><i>Se recomienda la administración del fármaco 1 h antes o 2 h después de las comidas.</i></p> <p><i>No tomar la doxiciclina con leche o productos lácteos para minimizar los posibles efectos sobre la absorción</i></p>

Efectos adversos y contraindicaciones¹

Contraindicaciones:

El medicamento está contraindicado en personas que han mostrado hipersensibilidad a doxiciclina a cualquiera de los compuestos inertes o a cualquiera de las tetraciclinas.

Precauciones Generales:

Uso en niños: Al igual que otras tetraciclinas, la doxiciclina forma complejos estables de calcio en el hueso en formación.



GENERALIDADES



El empleo de medicamentos del tipo de las tetraciclinas durante el desarrollo dental (última mitad del embarazo lactancia y niñez hasta 8 años de edad) puede dar lugar a un cambio de coloración permanente de los dientes (amarillo-gris-café). Esta reacción indeseable es más frecuente con su uso prolongado aunque ha sido observada después de tratamientos cortos repetidos. Asimismo se han reportado casos de hipoplasia del esmalte. Por lo tanto no debe utilizarse doxiciclina en los grupos de edades mencionados, a menos que no estén disponibles otros antibióticos que en caso de tenerlos sea poco probable su efectividad o bien que estén contraindicados. Sin embargo doxiciclina puede usarse para tratamiento del ántrax incluyendo el ántrax por inhalación (postexposición) en este grupo de pacientes.

General: Según lo investigado desde el enfoque médico, se ha reportado la presencia de abombamiento de fontanelas en infantes e hipertensión intracraneal benigna en adultos que han recibido dosis terapéuticas completas. Estos efectos desaparecieron rápidamente al suspender su administración.

Se ha reportado la aparición de colitis pseudomembranosa con el empleo de todos los antibióticos incluyendo doxiciclina siendo la severidad de grado leve a casos con riesgo para la vida. Es importante considerar este diagnóstico en pacientes que presentan diarrea subsecuente a un tratamiento con antibióticos. El uso de antibióticos puede ocasionalmente conducir al desarrollo de organismos no sensibles incluyendo hongos. Es esencial la observación constante del paciente. Si aparece una infección por organismos resistentes el antibiótico debe suspenderse y se instituirán las medidas terapéuticas apropiadas.

La acción antianabólica de las tetraciclinas puede dar lugar al aumento de nitrógeno ureico en la sangre. Los estudios realizados hasta la fecha indican que esto no sucede



GENERALIDADES



CAPÍTULO 3:

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Optimización del método analítico para cuantificar Doxiciclina en plasma humano

Tomando como punto de partida las condiciones cromatográficas previamente reportada en la literatura, se realizaron modificaciones con la finalidad de optimizar el método analítico. Para ello se evaluaron las siguientes condiciones:

3.1.1. Selección de las condiciones cromatográficas.

Se realizó la determinación de las condiciones iniciales del sistema cromatográfico; tales como la columna, fase móvil, longitud de onda de máxima absorción y selección del estándar interno.

➔ Columna; se evaluó la respuesta de la doxicilina en las siguientes columnas cromatográficas, esta selección estuvo orientada a la elección de la mejor opción de trabajo, la cual nos permitiera obtener parámetros cromatográficos óptimos (punto 3.1.1.1.).

Las columnas cromatográficas probadas fueron las siguientes:

Nombre	Especificaciones
Xterra MS Waters	5µm, 4.6 x 150 mm
YMC ODS AQ	5µm 3.0 x 150 mm
Spherisorb ODS2	5µm, 4.6 x 150mm
Gemini C18	5µm 4.6 x 250 mm



PARTE EXPERIMENTAL



- **Fase móvil;** considerando que la doxiciclina presenta tres valores de pKa (3.4, 7.7 y 9.4) se apreció que era necesario emplear una solución amortiguadora para regular el grado de ionización de la molécula, siendo más adecuado trabajar en un medio ácido, con el fin de tener una mejor resolución entre los picos de la DCX y la TCC,. Se probó la respuesta de la doxiciclina con soluciones amortiguadoras de acetatos y de oxalatos, en diferentes proporciones con acetonitrilo.

- **Longitud de onda;** los valores de longitud de onda de trabajo reportados en la literatura) son muy discordantes entre sí para la Doxiciclina, como: 350 nm en Agua bidestilada¹³, 347 nm en ácido acético (5%): Metanol: Acetonitrilo (55:20:25, v/v/v)⁹, 346 nm¹⁷ y 365 nm en Metanol¹⁸, por lo que se decidió realizar un barrido tridimensional con el detector de arreglo de diodos a una solución de Doxiciclina en agua de 10 μ g/mL.

- **Estándar interno;** la selección estuvo basada en aquella que presentará valores de recobros más alto, que se tuvieran tiempos de retención más cortos y que no presentaran interferencias con los componentes endógenos del plasma. Se trabajó con tetraciclina y piroxicam.



3.1.1.1. El criterio de aceptación para las condiciones indicadas estuvo basado en las siguientes especificaciones:

Resolución	Mayor a 2 entre la doxiciclina y el estándar interno
Simetría	Cercana a 1
Eficiencia	Superior a los 2000 platos teóricos

3.1.2. Selección del método de extracción.

Tal y como se puede apreciar en el cuadro 10, el tratamiento de la muestra biológica para la cuantificación de la Doxiciclina en la mayoría de los casos consisten métodos líquido-líquido y muy pocos en extracción en fase sólida. Por lo que se tomó como primera opción el probar métodos de extracción líquido-líquido, por cuestiones de simplicidad y de economía. Los disolventes de extracción evaluados fueron acetonitrilo¹⁹, diclorometano y ácido perclórico, con base a lo reportado en la literatura, además de buscar minimizar la presencia de impurezas provenientes del plasma. El criterio de aceptación se basó en el disolvente que presentará mayor por ciento de recobro y preciso en los tres niveles de concentración evaluados.



3.1.3. Curva estándar y muestras control. En base a los parámetros farmacocinéticos de C_{max} , se propuso el siguiente intervalo de trabajo para la curva estándar.

Cuadro 11. Curva estándar y muestras control propuestas inicialmente.

Curva estándar		Muestras control	
Clave	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	clave	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
CC1	0.1	MC1	0.25
CC2	0.5	MC2	2.5
CC3	1.0	MC3	4.5
CC4	2.0		
CC5	3.0		
CC6	4.0		
CC7	5.0		

Durante la preparación de las muestras correspondientes a la curva estándar y a las muestras control se consideró la pureza de las sustancias de referencia.

3.1.4. Optimización del método

Optimización del método. Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y el método de extracción, el método analítico es factible de optimizarse con el fin de mejorar al máximo la separación cromatográfica. Se observa que los parámetros a evaluar son: la resolución (R), factor de capacidad (k) y eficiencia de la columna (N).



3.2. MATERIAL, INSTRUMENTOS Y EQUIPO.

3.2.1. Materiales

- Tubos de ensaye de vidrio de 16 x 100 mm
- Tubos de polipropileno de 2 mL
- Combitips para pipeta de repetición Repeater Plus
- Puntas para micropipetas de 200 y 1000 μ L
- Matraces volumétricos de 10, 25, 500, 1000 y 2000 mL
- Vasos de precipitados de 50, 100, 1000 y 2000 mL
- Probetas de 50, 100, 500 y 1000 mL
- Pipetas de transferencia de plástico
- Sistema de filtración para disolventes HPLC
- Frascos graduados para fase móvil de 1000 y 2000 mL

3.2.2. Reactivos

- Lote de plasma identificado como MB-020, constituido de 9 unidades de plasma humano proveniente del Banco de Sangre del Hospital Médica Sur con pruebas serológicas negativas a: Anti-T Cruzi ELISA, ANTI-VIH + 2 ELISA, Ags HB ELISA, ANTI-VHC ELISA, ANTI-T Pallidum ELISA y Rastreo de Anticuerpos Irregulares.
- Acetonitrilo grado HPLC, marca Mallinckrodt
- Agua grado HPLC (Milli Q)
- Ácido oxálico dihidratado grado reactivo, marca J.T. Baker
- Ácido perclórico grado reactivo, marca DEQ, pureza 69.9%



PARTE EXPERIMENTAL



3.2.3. Sustancias de referencia

- Hiclato de Doxiciclina (DCX) clave interna SR-08-2005 pureza 87.9 %
- Clorhidrato de Tetraciclina (TCC) clave interna SR-02-2006 pureza 100.0%
- Cafeína clave interna ET-003 Pureza 99.9 %
- Ácido Salicílico de COSUFAR clave interna EP-002 Pureza 99.5 %
- Paracetamol de COSUFAR clave interna EP-004 Pureza 100.3 %

3.2.4. Consumibles cromatográficos

- Microviales de 300 µL marca Agilent No. de parte 5180-0841
- Microviales de 2 mL marca Agilent No. de parte 5181-3375
- Casquillos para microviales
- Camisas para microviales de 300 µL Marca Agilent
- Membranas de filtración de 0.45 µm Marca Millipore No de catálogo HVLPO4700
- Columna cromatográfica Gemini 5u C18 110A de 250 x 4.6 mm marca Phenomenex clave interna 27N, número de serie 286131-1, número de parte 00G-4435-EO.
- Precolumna XTerra RP C18 5 µm de 3.9 X 20 mm clave interna 12N, número de parte 186000662.



3.2.5. Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR), Agilent modelo 1100 que consta de los siguientes módulos:
 - Bomba cuaternaria Modelo G1311A No. Serie DE11114958
 - Detector de arreglo de diodos con microcelda Modelo G1315A No. Serie DE11112964
 - Automuestreador automático Modelo G132A No. Serie DE23910875
 - Termostato del automuestreador Modelo G1330A No. Serie DE13205189
 - Compartimento de columna con termostato Modelo G1322A No. de Serie DE11121925
 - Desgasificador en línea Modelo G1322A No. Serie JP05030070
 - Programa Chemstation Rev. A. 08.03 (847)
 - Unidad de poder In-interrumpible marca EBS Modelo RL-2K No. Serie 1640
- Agitadores tipo vortex marca IKA modelo MS1-S1 Minishaker No. serie 03.100997 y 03.100996
- Balanza analítica marca Sartorius Modelo BP 121S No. Serie 12703165
- Balanza de precisión marca Sartorius Modelo BP 410 Serie: 12707800
- Baño de ultrasonido marca Branson Modelo 5510R-DTH No. serie RNCO80151637E
- Bomba de presión al vacío marca Millipore No. Catalogo XX55 000 00. No. Serie 0102704295



PARTE EXPERIMENTAL



- Centrífuga refrigerada marca Jouan modelo MR23i con No. de serie 30109386.
- Equipo de agua bidestilada marca Millipore modelo Ellix 5 No de catálogo ZLXS6005Y No de Serie FOPN50215E
- Equipo de agua HPLC marca Millipore modelo Milli Q Gradient A10 No de catálogo ZMQ56VOTY No de Serie B1KN36204A
- Sistema Manifold para extracción en fase sólida
- Parrilla termoagitadora marca Thermolyne Modelo Cimarec 2 No. Serie 10690182599
- Parrilla termoagitadora marca VELP Scientific Modelo ARE/10.1162 No. Serie 1013255
- Pipeta de volumen variable marca Eppendorf Modelo 20-200 μ L No. Serie 305085
- Pipeta de repetición marca Eppendorf modelo Repeater Plus No. Serie 4091825.
- Pipetas de volumen variable marca Eppendorf Modelo 100-1000 μ L No. Serie 296194 y 296161
- Potenciómetro (pHmetro) marca Corning modelo 430 No. Serie 10983
- Refrigerador marca Thermoforma Modelo 3771 No. Serie: 785012072
- Sistema de filtración de disolventes marca Millipore
- Termohigrómetro marca Daigger Modelo KX14442 No. serie: 21262637
- Termohigrómetro marca Control Company Modelo NX14442 No. Serie 41486650
- Ultracongelador vertical marca Thermoforma modelo 923 No. Serie 487625224.



3.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

3.3.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN

3.3.1.1. Solución de ácido perclórico al 10 % v/v

En una probeta, se midió 71.5 mL de ácido perclórico con una pureza de 69.9%, se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL con agua grado HPLC, se llevó a volumen.

3.3.2. PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

3.3.2.1. Solución de ácido oxálico 0.02 M

Se pesó 3.6 g de ácido oxálico dihidratado, se mezcló con 1.5 L de agua grado HPLC y se llevó a aforo en un matraz de 2L con mas agua grado HPLC.

3.3.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR

3.3.3.1. Solución stock de DCX (500 µg/mL) en agua

Se pesó 0.0315 g de sustancia de referencia Hiclato de Doxiciclina (el equivalente a 12.5 mg de DCX) y se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió y se llevo con agua grado HPLC.

3.3.3.2. Solución DCX de 10 µg/mL en plasma

Se tomó una alícuota de 0.5 mL (500 µL) de la solución stock de DCX (500 µg/mL), se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó a volumen con plasma.

3.3.3.2.1. Solución DCX de 10 µg/mL en agua

Se tomó una alícuota de 0.5 mL (500 µL) de la solución stock de DCX, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó a volumen con agua.



3.3.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE REFERENCIA.

3.3.4.1. Solución stock de Clorhidrato de Tetraciclina (TCC) (1 mg/mL).

Estándar interno

Se pesaron 0.02216 g de sustancia de referencia Clorhidrato de Tetraciclina (el equivalente a 10 mg de TCC) y se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió y se llevo con agua grado HPLC.

3.3.4.2. Solución TCC de 10 µg/mL en agua.

Se tomó 0.100 mL de la solución de TCC de 1000 µg/mL, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevo al aforo con agua grado HPLC.

3.3.5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES, CURVAS ESTÁNDAR Y MUESTRAS CONTROL

3.3.5.1 Solución combinada de DCX/TCC (15 µg/mL- 5 µg/mL) para adecuabilidad

Se tomó una alícuota de 0.5 mL de la solución stock de TCC (1 mg/mL) y una alícuota de 1.5 mL de la solución stock de DCX (500 µg/mL) en agua, se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevo al aforo con agua grado HPLC.

3.3.5.2 Preparación de la curva estándar y muestras control en plasma

A partir de la solución de DCX de 10 µg/mL en plasma, se preparó la curva estándar y muestras control como se indica en el siguiente cuadro:



PARTE EXPERIMENTAL



Cuadro 12 a. Preparación de la curva estándar intervalo 0.196 a 2 µg/mL

Curva Estándar			
Alicuota sol DCX 10 µg/mL plasma (µL)	Plasma (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final (µg/mL)
40	2	2.040	0.196
60	2	2.060	0.291
100	2	2.100	0.476
300	2	2.300	1.304
400	2	2.400	1.667
500	2	2.500	2.000

Cuadro 12 b. Muestras control de DCX en plasma

Muestras Control			
Alicuota sol DCX 10 µg/mL plasma (µL)	Plasma (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final (µg/mL)
50	2	2.050	0.244
200	2	2.200	0.909
450	2	2.450	1.837



3.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN

El siguiente diagrama muestra el método de extracción utilizado para la DCX

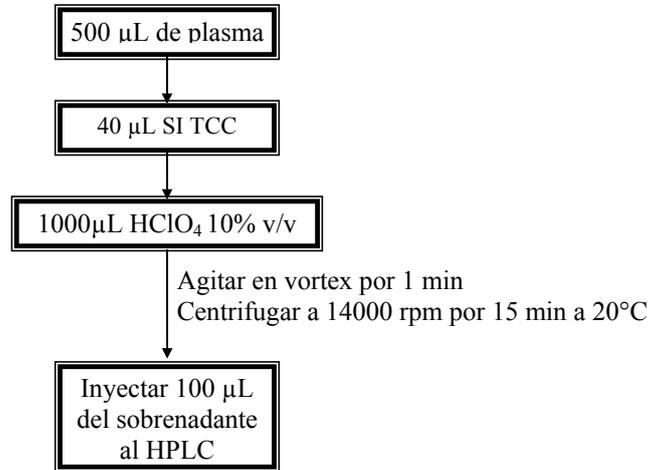


Figura 5. Diagrama de flujo del método de extracción de DCX en plasma

3.5.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

En la fase de desarrollo se establecieron las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna	Gemini 5µm C18 110A de 250 x 4.6 mm
Precolumna	Precolumna XTerra RP C18 5 µm de 3.9 X 20 mm
Fase móvil	[Ácido Oxálico (0.02M):ACN], 75:25, % v/v
Velocidad de Flujo	1.3 mL/min
Temperatura de la columna	40° C
Volumen de inyección	100 µL
Detección	264 nm
Tiempo de Corrida	7 minutos



3.6. VALIDACIÓN DEL SISTEMA

3.6.1. Adecuabilidad del sistema

Al inicio de cada corrida analítica inyectar por quintuplicado la solución para la evaluación de la adecuabilidad del sistema. El sistema se considera adecuado si se cumple con los siguientes criterios:

Parámetro	Criterio
Altura del pico	$CV \leq 2 \%$
Tiempo de retención	$CV \leq 2 \%$
Coleo	Inferior a 2
Platos teóricos (N) (método tangente)	≥ 2000
Resolución (método tangente)	≥ 2

3.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para evaluar la confiabilidad del método se siguieron los lineamientos que marca la NOM 177²⁰ que se describen a continuación:

3.7.1. Linealidad

Para evaluar la linealidad del método, se prepararon 3 curvas de calibración en plasma contemplando las concentraciones de 0.196 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$, así como un blanco de plasma. Las muestras se procesaron de acuerdo al método propuesto y se inyectaron al cromatógrafo. Para cada curva de calibración se determinó la altura, se estableció el modelo matemático a utilizar para establecer la relación concentración – respuesta, y se calculó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r).



3.7.2. Precisión del método.

3.7.2.1. Repetibilidad del método.

La precisión del método se evaluó con los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad. Para determinar la repetibilidad del método, se prepararon por quintuplicado las muestras control baja, media y alta (0.244, 0.909 y 1.837 µg/mL) y se determinó la concentración recuperada interpolando el valor de las alturas en una curva de calibración preparada como se indica en la linealidad del método. Con estos datos se calculó el coeficiente de variación (CV) de las concentraciones recuperadas.

El coeficiente de variación (CV) se obtiene por medio de la siguiente expresión matemática:

$$CV = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio}} \times 100$$

3.7.2.2. Reproducibilidad del método.

Se evaluó la reproducibilidad intralaboratorio (un analista días diferentes) y reproducibilidad entre analistas (tres analistas), para lo cual:

La reproducibilidad del método se determinó con las muestras control preparados por duplicado en 3 días de trabajo por los analistas. Se calculó el coeficiente de variación (CV) de las concentraciones recuperadas.



3.7.3. Exactitud del método.

La exactitud del método se estableció a partir de los datos de repetibilidad, determinando la Desviación estándar absoluta (DEA) del valor promedio de las concentraciones experimentales, de cada nivel, con respecto a la concentración nominal de la muestra, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DEA} = \frac{\text{Concentración Nominal} - \text{Concentración Recuperada}}{\text{Concentración Nominal}} \times 100$$

3.7.4. Recobro absoluto

El recobro se determinó preparando 2 series de muestras control una en plasma y otra en solución. Las muestras plasmáticas se procesaron e inyectaron de acuerdo al método propuesto, en tanto que las muestras en solución se inyectaron directamente al cromatógrafo.

Asimismo, se comparó la relación promedio de las alturas obtenidas en plasma con las obtenidas en solución.

El por ciento de recobro se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ De Recobro} = \frac{\text{Respuesta en Plasma}}{\text{Respuesta en solución}} \times 100$$



3.7.5. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se determinó preparando por quintuplicado la concentración más baja de la curva de estándar y con los datos obtenidos se calculó la precisión y exactitud.

3.7.6. Límite de detección

El límite de detección (LD) fue determinado como la concentración a la cual la señal (altura) del analito es al menos tres veces mayor que el nivel de ruido.

3.7.7. Selectividad

Para evaluar la selectividad del método se prepararon muestras de plasma adicionadas con: ácido salicílico, cafeína, paracetamol, heparina de sodio y heparina de litio. Para que el método cumpla con esta prueba no debe tener interferencia en el tiempo de retención de la Doxiciclina y tampoco con el estándar Interno (Clorhidrato de tetraciclina).

3.7.8. Estabilidad

Las pruebas de estabilidad se llevaron a cabo para demostrar que la Doxiciclina conserva sus propiedades en el plasma durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. Ya que es bien sabido que los medicamentos pueden ser degradados en el plasma durante el almacenamiento o el análisis debido a la temperatura, luz, aire y enzimas.



3.7.8.1. Estabilidad a temperatura ambiente.

Para realizar esta prueba se prepararon 2 series de muestras control los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente y se procesaron e inyectaron a las 6 horas de permanecer a esta temperatura ambiente.

3.7.8.2. Estabilidad en el automuestreador.

Para realizar esta prueba se prepararon 2 series de muestras control, se procesaron de acuerdo a la técnica descrita en el punto 3.4. Se mantuvieron en la solución de inyección dentro del automuestreador del cromatógrafo (Temperatura de 4° C) y se inyectaron después de 24 horas. Para cada uno de los tiempos se calculó la concentración recuperada y se evaluó la exactitud.

3.7.8.3. Estabilidad en ciclos de congelación y descongelación.

Para comprobar que la muestra es estable durante el proceso de congelación – descongelación. Se prepararon 2 series de muestras control los cuales se almacenaron a -70° C. Al final de cada ciclo se determinó la cantidad de Doxiciolina recuperada, la exactitud y precisión de los valores obtenidos calculando el por ciento de desviación absoluta.

3.7.8.4. Estabilidad bajo condiciones de almacenamiento (a largo plazo).

Para esta prueba se prepararon 2 series de muestras control de Doxiciolina en plasma, las cuales se almacenaron a -70 °C. Las muestras se analizaron a los 120 días



PARTE EXPERIMENTAL



empleando el método descrito en el punto 3.4. Los resultados se compararon contra valor nominal. Para lo cual se determinó exactitud y precisión.

3.7.9. Tolerancia

Se evaluó la tolerancia del método alterando 2 condiciones. La primera fue modificar la temperatura de trabajo de la columna a 25° C en lugar de 40° C. La segunda modificación fue la proporción de la fase móvil de Ácido Oxálico (0.02M):ACN, 75:25, % v/v a Ácido Oxálico (0.02M):ACN, 70:30, % v/v.

3.8. El Criterio de aceptación utilizado para el método fue el siguiente:

Parámetro	Criterio de aceptación
Selectividad	No interferencia de los analitos en el tiempo de retención de DCX
Linealidad	Valor de r superior a 0.99
Precisión	
Repetibilidad	Valor de CV \leq al 15.0 %
Reproducibilidad	Valor de CV \leq al 15.0 %
Exactitud	Valor de DEA \leq al 15.0 %
Límite de cuantificación	Valores de CV y DEA \leq al 20.0 %
Límite de detección	La altura del pico de DCX debe ser al menos 3 veces la señal de ruido
Recobro absoluto	Valores promedio % de recobro con CV \leq al 15.0 %
Estabilidad	
Condiciones de almacenamiento	Valores de CV y DEA \leq al 15.0 %
Temperatura ambiente	Valores de CV y DEA \leq al 15.0 %
Ciclos de congelación-descongelación	Valores de CV y DEA \leq al 15.0 %
Automuestreador	Valores de CV y DEA \leq al 15.0 %
Tolerancia	Valores de CV y DEA \leq al 15.0 %



CAPÍTULO 4:

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Desarrollo del método analítico para cuantificar Doxiciclina en plasma humano

Columna

Se seleccionó la columna Gemini 5 μ m C18 110A de 250 x 4.6 mm, ya que presentaba mayor carga de carbono, mayor resistencia a valores de pH ácidos, y sobretodo los picos de doxiciclina presentaron una mejor resolución respecto al pico del estándar interno y los componentes endógenos del plasma, mejor simetría y mayor altura.

Fase móvil

Al analizar los cromatogramas de doxiciclina con la fase móvil de solución amortiguadora de acetato 0.01M a pH de 2.5: ACN, [70:30 (v/v)], se pudo apreciar que los picos en fase móvil de acetato presentaban coileo, lo anterior debido a que la doxiciclina como todas las tetraciclinas forma un complejo quelato divalentes y trivalentes con el calcio o aluminio de las columnas. En cambio, la simetría del pico correspondiente a DCX, presentó una mejor simetría al emplear la solución de oxalatos. Esto se debe a que la estructura del ácido oxálico presenta dos cadenas quelantes laterales, lo que permite una mayor afinidad de los analitos por la fase móvil respecto a la columna cromatográfica.



Estándar interno

El clorhidrato de tetraciclina, al contar con una estructura química similar a la de la doxiciclina, resultó más adecuado como estándar interno, además de no presentar interferencia de los componentes endógenos del plasma.

Detección:

El barrido espectral de la doxiciclina nos permitió determinar que la longitud de onda de máxima absorción era de 264 nm y sin interferencia de la matriz biológica, ver figuras 6 y 7.

En base a todo lo anterior, se determinaron las condiciones cromatográficas finales descritas en el numeral 3.5.1.

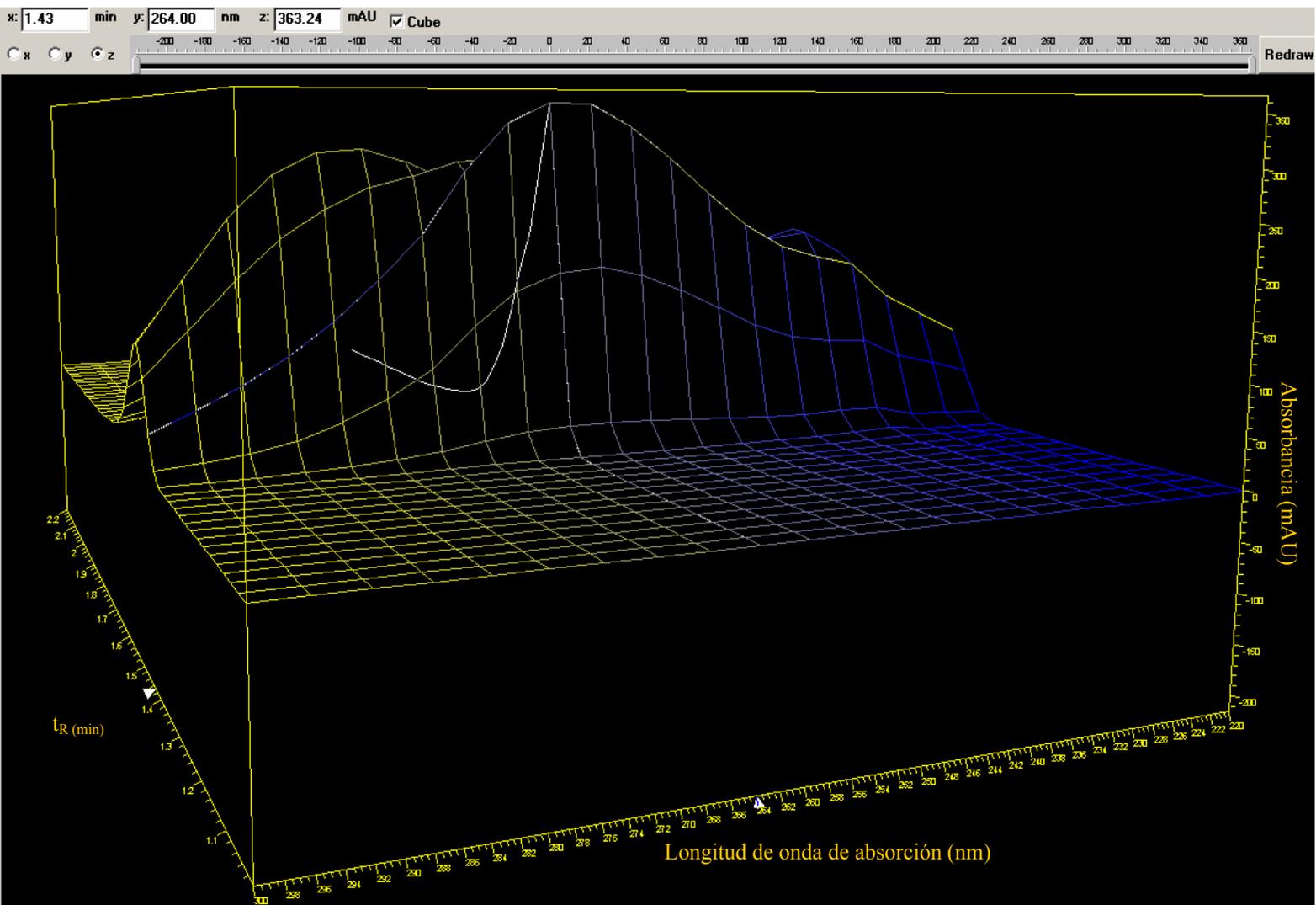


Figura 6. Barrido espectral de la doxiciclina

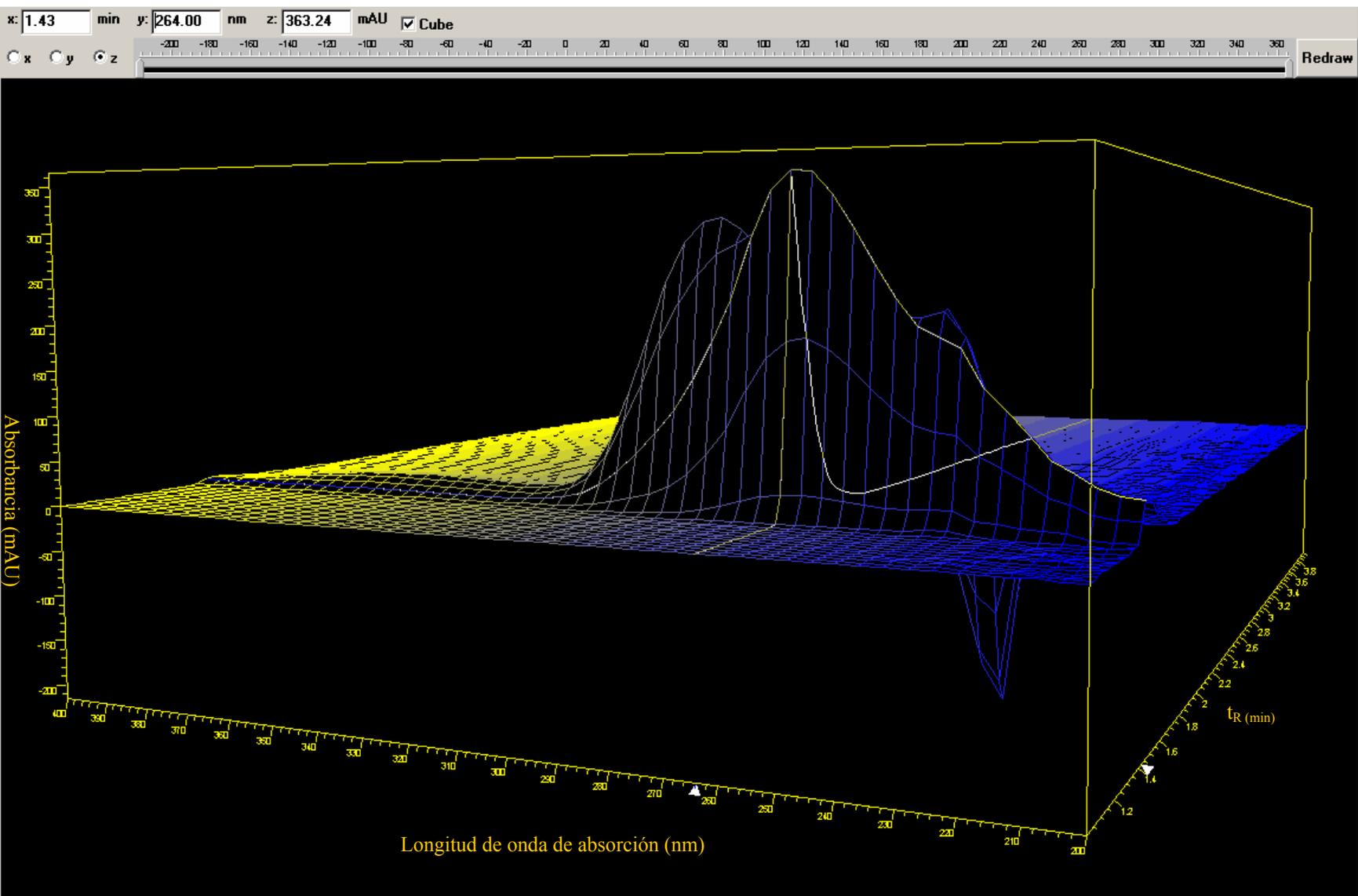


Figura 7. Barrido espectral de la doxiciclina de 220 a 300nm



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Los resultados de la validación fueron los siguientes:

4.1. Linealidad del método.

La figura 8 muestra la linealidad del método analítico en un intervalo de concentración de 0.196 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo un coeficiente de correlación (r) promedio de 0.9995.

En el cuadro 13 se presentan los valores de la relación de alturas de las 3 curvas preparadas en plasma para evaluar la linealidad del método, en donde se observa un % C.V. de las alturas varía entre 2.0 y 6.9% demostrando que dicha relación matemática es reproducible.

Cuadro 13. Linealidad del método analítico en el intervalo de 0.196 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$ para cuantificar DCX en plasma humano

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Relación de alturas (altura DCX/ altura TCC)				CV (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	
0.196	0.169	0.186	0.194	0.183	6.9
0.291	0.250	0.253	0.282	0.262	6.9
0.476	0.406	0.434	0.439	0.426	4.2
1.304	1.118	1.119	1.157	1.131	2.0
1.667	1.431	1.557	1.577	1.522	5.2
2.000	1.745	1.853	1.863	1.821	3.6
Pendiente	0.2257	0.2402	0.2408	0.2356	
Intercepto	-0.0053	-0.0136	0.0030	-0.0053	
Correlación	0.9999	0.9986	0.9992	0.9995	



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

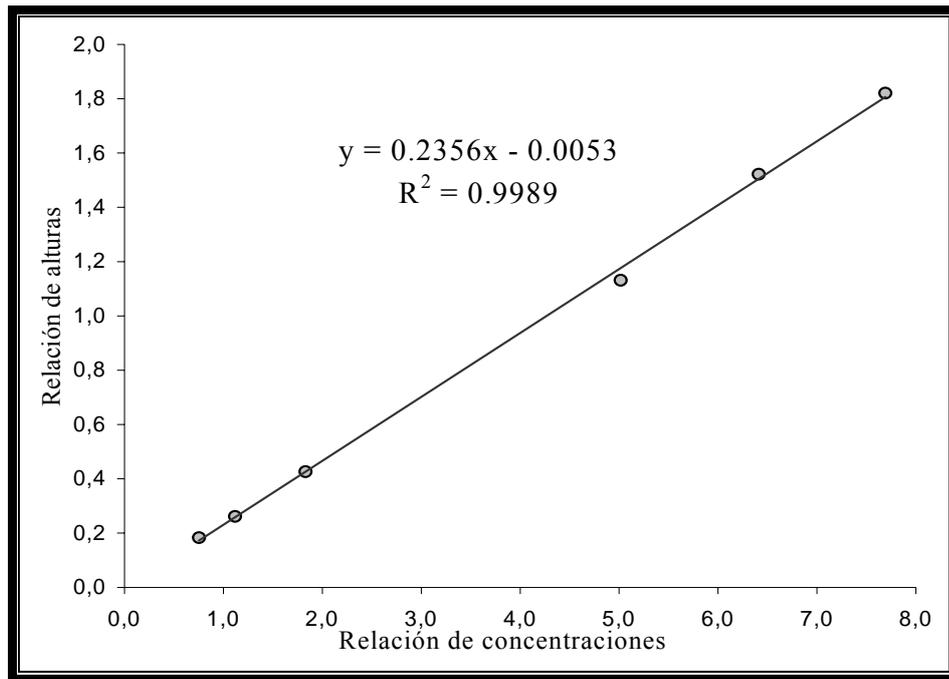


Figura 8. Linealidad del método analítico para cuantificar Doxiciolina en plasma humano.

Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)							
	Curva 1	DEA	Curva 2	DEA	Curva 3	DEA	Promedio	CV (%)
0.196	0.201	2.7	0.216	10.1	0.206	5.3	0.208	3.6
0.291	0.294	1.0	0.288	1.0	0.302	3.7	0.295	2.3
0.476	0.474	0.5	0.484	1.8	0.471	1.1	0.476	1.5
1.304	1.294	0.8	1.226	6.0	1.246	4.4	1.255	2.8
1.667	1.655	0.7	1.700	2.0	1.700	2.0	1.685	1.5
2.000	2.016	0.8	2.020	1.0	2.009	0.5	2.015	0.3



4.2. Precisión y exactitud del método.

De acuerdo al cuadro 14, el método fue repetible a los tres niveles de concentración correspondientes a las muestras control baja, media y alta, presentando valores máximos para el %CV de 3.8% y 11.5% para la Desviación Estándar Absoluta (DEA).

En el cuadro 14a y 14b muestran la reproducibilidad intra-analista fue demostrada al obtener valores de CV y DEA inferiores al 10.4 % para tres analistas, de igual forma la reproducibilidad inter-analista cumplió con el criterio de CV y DEA al ser de 8.5 y 5.2 %, respectivamente.

Con base a lo anterior se demostró que el método es preciso y exacto.

Cuadro 14 Precisión y exactitud (Repetibilidad) del método analítico para cuantificar DCX en plasma

Muestras Control			
Replica	0.244 µg/mL	0.909 µg/mL	1.837 µg/mL
1	0.274	0.870	2.044
2	0.262	0.933	2.030
3	0.248	0.935	2.015
4	0.262	0.881	2.061
5	0.270	0.910	2.093
Promedio	0.263	0.906	2.049
%CV	3.8	3.3	1.5
% DEA	7.8	0.3	11.5



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Cuadro 14a. Precisión y exactitud (Reproducibilidad intra-analista) del método analítico para cuantificar DCX en plasma

Día	Réplica	Analista 1			Analista 2			Analista 3		
		0.244 µg/mL	0.909 µg/mL	1.837 µg/mL	0.244 µg/mL	0.909 µg/mL	1.837 µg/mL	0.244 µg/mL	0.909 µg/mL	1.837 µg/mL
1	1	0.249	0.941	2.007	0.244	0.900	1.897	0.278	1.029	2.120
	2	0.249	0.940	1.977	0.243	0.905	1.819	0.274	1.038	2.101
2	1	0.254	0.960	2.002	0.224	0.792	1.626	0.225	0.874	1.784
	2	0.250	0.970	1.970	0.210	0.800	1.661	0.225	0.877	1.771
3	1	0.250	0.959	2.005	0.238	1.016	2.026	0.261	1.001	1.927
	2	0.249	0.902	2.161	0.228	1.024	2.134	0.244	1.006	2.128
Promedio		0.250	0.946	2.021	0.231	0.906	1.861	0.251	0.971	1.972
% CV		0.9	2.6	3.5	5.7	11.1	10.7	9.4	7.8	8.5
% DEA		2.5	4.0	10.0	5.2	0.3	1.3	2.8	6.8	7.3

Cuadro 14b. Precisión y exactitud (Reproducibilidad inter-analista) del método analítico para cuantificar DCX en plasma

Analista	Día	Réplica	0.244 µg/mL	0.909 µg/mL	1.837 µg/mL
1	1	1	0.249	0.941	2.007
		2	0.249	0.940	1.977
	2	1	0.254	0.960	2.002
		2	0.250	0.970	1.970
	3	1	0.220	0.999	1.861
		2	0.214	1.017	1.900
2	1	1	0.244	0.900	1.897
		2	0.243	0.905	1.819
	2	1	0.224	0.792	1.626
		2	0.210	0.800	1.661
	3	1	0.237	1.020	1.983
		2	0.252	0.989	1.918
3	1	1	0.278	1.029	2.120
		2	0.274	1.038	2.101
	2	1	0.225	0.874	1.784
		2	0.225	0.877	1.771
	3	1	0.235	0.903	2.201
		2	0.225	0.910	2.193
Promedio			0.244	0.941	1.951
% CV			7.1	7.9	8.3
% DEA			0.0	3.5	6.2



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



4.3. Recobro

El recobro promedio para Doxiciclina fue de 59.6 % y 77.7 % para el estándar interno Tetraciclina.

Cuadro 15. Recobro del método analítico para cuantificar DCX en plasma

DOXICICLINA			TETRACICLINA		
MUESTRAS	ALTURAS		Estándar	ALTURAS	
CONTROL	Sistema	Método	Interno	Sistema	Método
BAJA					
0.244 µg/mL	1.10173	0.71848		3.31806	2.43276
	1.11290	0.67580		3.07371	2.36001
	1.18936	0.70672		3.12485	2.34429
Recobro		61.7	5 µg/mL	2.89498	2.36852
	4.45916	2.62206		3.13467	2.36679
MEDIA				3.09885	2.42585
0.909 µg/mL	4.51055	2.66554		3.07616	2.40481
	4.58075	2.64164		2.97277	2.38530
Recobro		58.5		3.02082	2.41531
	8.93961	5.42067			
ALTA			PROMEDIO	77.7	
1.837 µg/mL	9.23939	5.29546			
	9.28601	5.36244			
Recobro		58.5			
RECOBRO					
PROMEDIO		59.6			
% C. V.		4.1			



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



4.4. Límite de cuantificación

Se estableció como límite de cuantificación, la concentración correspondiente al punto mas bajo de la curva estándar. El valor del límite de cuantificación para DCX fue de 0.196 $\mu\text{g/mL}$ con valores de CV y DEA de 6.6 y 5.0 %. Ver cuadro 16.

Cuadro 16. Límite de cuantificación del método analítico para cuantificar DCX en plasma

Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración obtenida ($\mu\text{g/mL}$)
0.196	0.196
	0.187
	0.216
	0.216
	0.214
Promedio	0.2
% CV	6.6
% DEA	5.0

4.5. Límite de detección

El límite de detección (LD) fue determinado como la concentración a la cual la señal (altura) del analito es al menos tres veces mayor que el nivel de ruido. El LD para DCX fue de 0.099 $\mu\text{g/mL}$ (cuadro 17).

Cuadro 17. Límite de detección del método analítico para cuantificar DCX plasma

Muestra	Replica	Ruido
Blanco de plasma	1	0.0557
	2	0.0722
	3	0.0814
	Promedio	0.0698
	Nivel de ruido x 3	0.2093
Muestra	Replica	Altura
0.099 $\mu\text{g/mL}$	1	0.2409
	2	0.2551
	3	0.2465
	Promedio	0.2475



4.6. Selectividad del método

Después de añadir Cafeína, Ácido salicílico, Paracetamol, Heparina de sodio y Heparina litio a diferentes muestras plasmática y procesarlas utilizando el método descrito anteriormente en el punto 3.4, no se observó ninguna señal que interfiera con el pico de interés, por lo cual el método se consideró selectivo para la cuantificación de Doxyciclina en plasma usando Clorhidrato de Tetraciclina como estándar interno.

Cuadro 18. Selectividad del método analítico para cuantificar DCX en plasma

Analito	Tiempo retención⁽¹⁾ (min)	Selectivo
Doxiciclina	5.61	NA
Tetraciclina	3.58	NA
Blanco de plasma	ND	Si
Cafeína	ND	Si
Ácido salicílico	ND	Si
Paracetamol	ND	Si
Heparina de sodio	ND	Si
Heparina litio	ND	Si

⁽¹⁾ Promedio de 3 determinaciones

ND = No detectable

NA = No Aplica

En la figura 9 se muestran los cromatogramas, en donde se aprecia que el método es selectivo a componentes endógenos de plasma y a los analitos indicados en el cuadro 18.



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

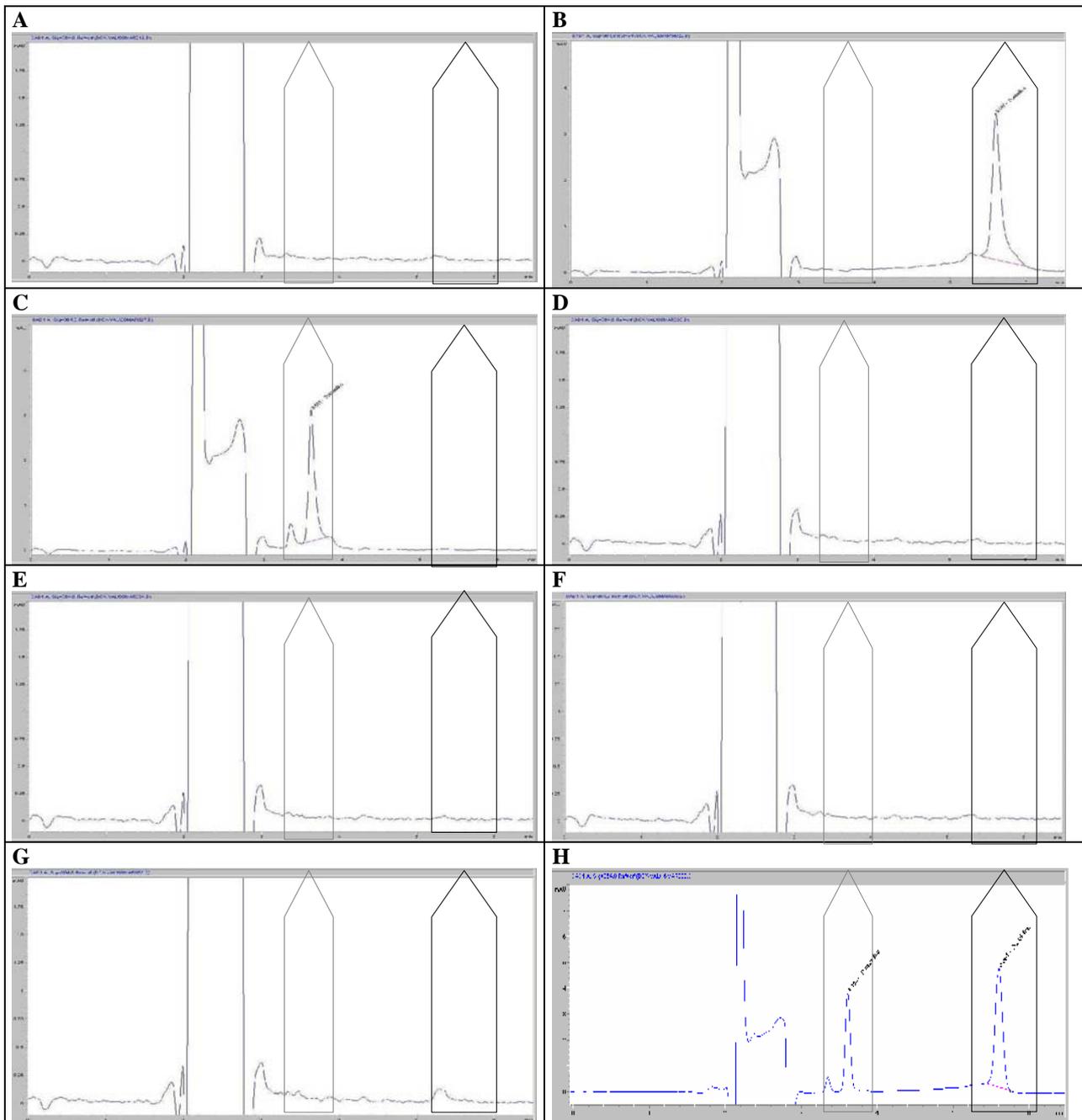


Figura 9. Selectividad del método para cuantificar Doxiciplina en plasma. A) Blanco de plasma humano. B) Plasma humano adicionado con 1µg/mL de DCX. C) Plasma humano adicionado con 1µg/mL de TCC. D) Plasma humano adicionado con 1µg/mL de Cafeína. E) Plasma humano adicionado con 1µg/mL de Ácido salicílico. F) Plasma humano adicionado con 1µg/mL de Paracetamol. G) Plasma humano adicionado con 1µg/mL de Heparina de Litio. H) Muestra en plasma humano de un voluntario. TR de la DCX se indica en negro y la TCC en gris.



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



4.7. Estabilidad

Se determinó la estabilidad de Doxiciclina bajo las siguientes condiciones:

4.7.1 Estabilidad a temperatura ambiente.

La DCX fue estable en plasma humano hasta por 6 horas a temperatura ambiente con valores de CV de 1.8 % y DEA de 1.5 %. (Ver cuadro 19)

Cuadro 19. Estabilidad a temperatura ambiente del DCX en plasma humano

Estabilidad a temperatura ambiente			
Tiempo = 6 horas			
Replica	0.244 µg/mL	0.909 µg/mL	1.837 µg/mL
1	0.245	0.905	1.850
2	0.244	0.885	1.804
Promedio	0.245	0.895	1.827
% CV	0.3	1.6	1.8
% DEA	0.4	1.5	0.5

4.7.2 Estabilidad en el automuestreador.

La DCX fue estable en ácido perclórico al 10 %, hasta por 24 h a 4 ° C con valores de CV de 2.4 % y DEA de 10.1 %. (Ver cuadro 20)

Cuadro 20. Estabilidad en el automuestreador del DCX en ácido perclórico al 10 %

Estabilidad en el automuestreador			
Tiempo = 24 horas			
Replica	0.244 µg/mL	0.909 µg/mL	1.837 µg/mL
1	0.216	0.842	1.661
2	0.223	0.841	1.711
Promedio	0.219	0.842	1.686
% CV	2.4	0.1	2.1
% DEA	10.1	7.4	8.2



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



4.7.3 Estabilidad en ciclos de congelación y descongelación.

La DCX fue estable en plasma humano hasta por 2 ciclos de congelación y descongelación con valores de CV de 1.7 % y DEA de 13.5 %. (Ver cuadro 21)

Cuadro 21. Estabilidad a ciclos de congelación y descongelación del DCX en plasma humano

Estabilidad ciclos de congelación-descongelación			
Ciclo 2			
Replica	0.244 µg/mL	0.909 µg/mL	1.837 µg/mL
1	0.244	1.037	1.860
2	0.239	1.027	1.880
Promedio	0.241	1.032	1.870
% CV	1.7	0.6	0.8
% DEA	1.1	13.5	1.8

4.7.4 Estabilidad bajo condiciones de almacenamiento (a largo plazo).

La DCX es estable en plasma humano hasta por 120 días a – 70° C con valores de CV \leq 1.4 % y DEA \leq 3.7 % (Ver cuadro 22)

Cuadro 22. Estabilidad bajo condiciones del almacenamiento del DCX a -70 °C en plasma humano

Estabilidad bajo condiciones almacenamiento			
Tiempo = 120 días			
Réplica	0.244 µg/mL	0.909 µg/mL	1.837 µg/mL
1	0.250	0.896	1.888
2	0.251	0.914	1.923
Promedio	0.250	0.905	1.906
% CV	0.4	1.4	1.3
% DEA	2.6	0.4	3.7



4.8. Tolerancia

Se evaluó al someter la columna a temperatura ambiente. Los tiempos de retención se incrementaron, por lo tanto no es tolerante ya que vario los tiempos de retención, aunque su % CV y % DEA cumplen. (Ver cuadro 23).

Cuadro 23. Tolerancia del método analítico a cambios de temperatura de la columna.

Columna a temperatura ambiente			
Réplica	Concentración (µg/mL)		
	0.244	0.909	1.837
1	0.221	0.884	1.799
2	0.217	0.852	1.881
Promedio	0.219	0.868	1.840
% CV	1.1	2.6	3.1
% DEA	10.3	4.6	0.2

Se evaluó al someter cambio de la proporción de la fase móvil. Los tiempos de retención se disminuyeron (Tetraciclina y Doxiciclina, 3.022 min y 3.982 min respectivamente), por lo que el método no tolera cambios en la fase móvil. (Ver cuadro 24)

Cuadro 24. Tolerancia del método analítico a cambios de la proporción de la Fase Móvil.

Proporción de la Fase Móvil (Ácido Oxálico 0.02M: ACN, 70:30)			
Réplica	Concentración (µg/mL)		
	0.244	0.909	1.837
1	0.420	1.847	3.679
2	0.506	1.878	3.665
Promedio	0.463	1.863	3.672
% CV	13.1	1.2	0.3
% DEA	89.7	104.9	99.9



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación se resumen los resultados de la validación del método analítico para cuantificar DCX en plasma humano:

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Dictamen
Selectividad	No interferencia de los analitos en el tiempo de retención de DCX	No interferencia de componentes endógenos del plasma, ácido salicílico, cafeína, paracetamol, heparina de sodio y heparina de litio.	Cumple
Linealidad	Valor de r superior a 0.99	Lineal en el intervalo de 0.196 a 2 µg/mL con valor promedio de r de 0.9995.	Cumple
Precisión y exactitud			
Repetibilidad	CV y DEA ≤ al 15.0 %	CV ≤ 3.8 % y DEA ≤ 11.5 %	Cumple
Reproducibilidad analista 1	CV y DEA ≤ al 15.0 %	CV ≤ 7.4 % y DEA ≤ 6.8 %	Cumple
Reproducibilidad analista 2	CV y DEA ≤ al 15.0 %	CV ≤ 10.4 % y DEA ≤ 3.8 %	Cumple
Reproducibilidad analista 3	CV y DEA ≤ al 15.0 %	CV ≤ 10.4 % y DEA ≤ 10.4 %	Cumple
Límite de cuantificación	CV y DEA ≤ al 20.0 %	0.196 µg/mL con un CV = 6.6 % y DEA = 5.0 %	Cumple
Límite de detección	La altura del pico de DCX debe ser 3 veces la señal de ruido	0.099 µg/mL	Cumple
Recobro absoluto	% recobro consistente en los tres niveles de concentración	Doxiciclina	Cumple
		Nivel bajo = 61.7 %	
		Nivel medio = 58.5 %	
		Nivel alto = 58.5 %	
		Promedio = 59.6 %	
		Tetraciclina	
		Promedio 77.7 %	
		CV = 4.1 %	
Estabilidad			
Condiciones de Almacenamiento	CV y DEA ≤ al 15.0 %	Hasta 120 días a -70° C con valores de CV ≤ 1.4 % y DEA ≤ 3.7 %.	Cumple
Temperatura ambiente	CV y DEA ≤ al 15.0 %	Hasta 6 horas a temperatura ambiente con CV ≤ 1.8 % y DEA ≤ 1.5 %	Cumple
Ciclos Congelación-Descongelación	CV y DEA ≤ al 15.0 %	Hasta 2 ciclos con valores de CV ≤ 1.7 % y DEA ≤ 13.5 %.	Cumple
Automuestreador	CV y DEA ≤ al 15.0 %	hasta 24 horas con valores de CV ≤ 2.4 % y DEA ≤ 10.1 %	Cumple
Tolerancia	CV y DEA ≤ al 15.0 %	CV ≤ 3.1 % y DEA ≤ 10.3 %	Cumple



Aplicación del Método Analítico a un estudio de Bioequivalencia

El método analítico se utilizó para la cuantificación de la Doxiciclina en Muestras plasmáticas provenientes de este estudio clínico para determinar la Bioequivalencia entre dos formulaciones de Doxiciclina en voluntarios sanos posterior a una dosis de 100 mg. La figura 10 muestra las gráficas promedio de los perfiles de concentración plasmáticas versus tiempo.

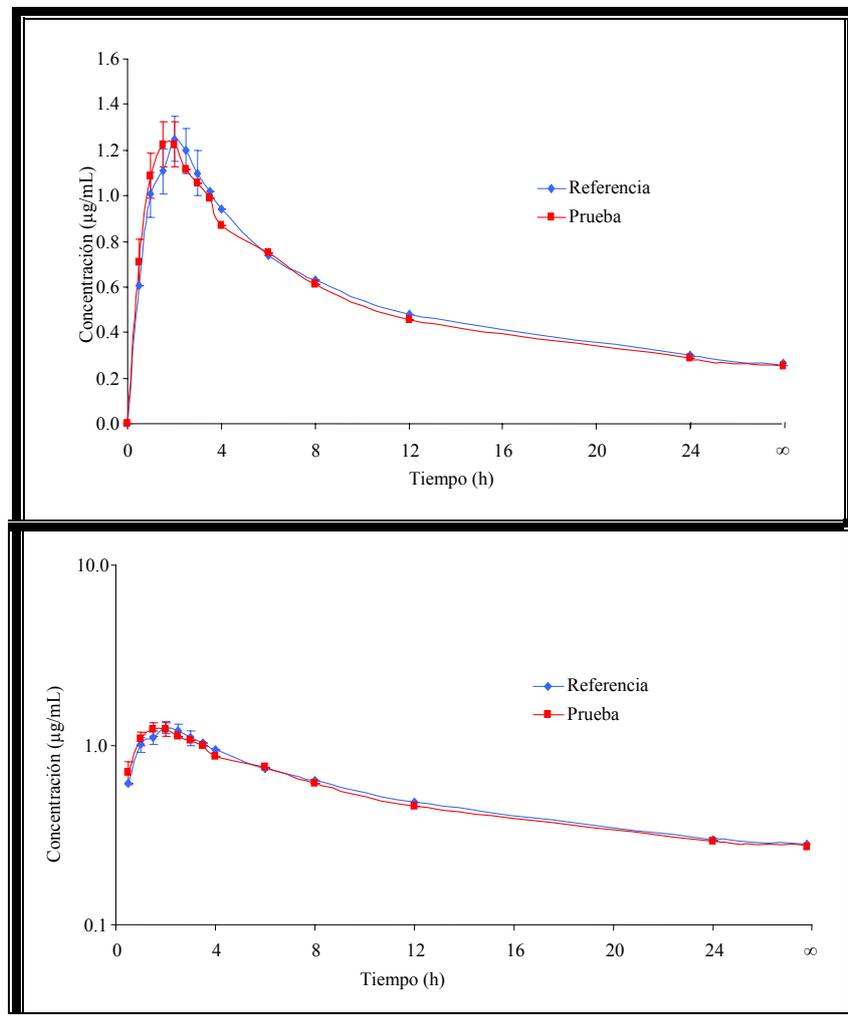


Figura 10. Gráfica de Concentración plasmática promedio de Doxiciclina ($\mu\text{g/mL}$) \pm EE después de la administración de los dos medicamentos. Arriba escala aritmética y Abajo escala logarítmica



CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos para cuantificar Doxiciclina en plasma humano, el cual es rápido, sencillo y económico.

El método demostró que es selectivo a componentes endógenos del plasma y otros fármacos, lineal en el intervalo de 0.196 a 2.0 µg/mL, preciso y exacto, la Doxiciclina es estable en plasma a -70° C hasta 120 días, a temperatura ambiente hasta 6 horas, hasta 2 ciclos de congelación y descongelación de temperatura ambiente a -70° C y en ácido perclórico al 10% en el automuestreador hasta por 24 h.

En base a lo anterior, se establece la confiabilidad del método analítico desarrollado para su aplicación en estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia o farmacocinética.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Goodman and Gilman. Ed. McGraw Hill-Interamericana. Decima edición. USA, 2004. 2011 pp.
2. <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s05.htm#TopOPage>
Consultada Mayo 2006.
3. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:232-60.
4. Fuente: Pérez-Trallero E, et al. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(9):520-9.
5. Rodríguez Miguel, González-Piñera José, Barreto Jesús, Lim Nora, Areu Alejandro, Pardo Armando. Tetraciclinas. *Acta Medica* 1998;8(1):75-9.
6. OMS. Medicamentos Esenciales 14.ª edición. Lista Modelo de la OMS (revisada en mayo de 2006). http://www.who.int/medicines/publications/EML14_SP.pdf
7. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. O'Neil, J. Ed. Merck & Co., Inc. Thirteenth Edition. USA, 2001. Pp. 3472-3473.
8. Clasificación ATC Disponible en URL:
<http://www.whocc.no/atcddd/indexdatabase/index.php>
Consultada el 16 Abr 2006.
9. Ruz N, Zabala M, Kramer M. G., et al. Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography Application to particulate drug delivery systems. *J Chromatography A*. 2004; 1031:295-301.
10. <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/>
Consultada el 13 Abr 2006.
11. Doxiciclina. Micromedex Healthcare Series. Disponible en URL:
www.micromedex.com.
Consultada el 28 Nov 2005.
12. Cuadro A-II-1. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Goodman and Gilman. Ed. McGraw Hill-Interamericana. Decima edición. USA, 2004.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



13. Axisa, B. Naylor, A. R. Bell, P. R. F. Thompson, M. M. Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissues. *J Chromatogr. B.* 2000; 744: 359-365.
14. Catterall, J. B., Cawston T. E. Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. *Arthritis Res Ther* 2003, 5:12-24.
15. Food and Drug Administration (FDA) Disponible en URL: http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/penG_doxy/default.htm
Consultada 13 Abr 2006.
16. Fuente: Dirección Ejecutiva de Autorización de Productos y Establecimientos. Catalogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para Farmacias y Público En General. Disponible en URL http://www.cofepris.gob.mx/mj/documentos/acuerdos/acuSec_16.pdf.
Consultada en Abril 2006.
17. Alsarra, I. A. Al-Said, M. S. Al-Kamis, K. I. Nazi, E. M. El-Sayed, Y. M. Al-Rashood, et. al. Comparative bioavailability study of doxycycline hyclate (equivalent to 100 mg doxycycline) capsules (doxycin vs vibramycin) for bioequivalence evaluation in healthy adult volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2004; 42: 373-377.
18. Cinquina, A. L. Longo, F. Anastasi, G. Gianetti, L. Cozzani, R. Validation of a high performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr. A.* 2003; 987: 227-233.
19. Santos, M. D. F. Vermeersch, H. Remon, J. P. Schelkens, M. Backer, P. de. Ducatelle, R. et. al. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma. *J Chromatogr. B.* 1996; 682: 301-308.
20. Norma Oficial Mexicana. NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.