

00563



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTUDIO PRELIMINAR PARA DETERMINAR
LA BIOEQUIVALENCIA DE KETOCONAZOL**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN FARMACIA
(BIOFARMACIA)**

P R E S E N T A:

LIC. RUTH RUIZ VASQUEZ

DIRECTORA: HELGI JUNK HOOK

MEXICO, 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: M en C Marcela Hurtado y de la Peña

Primer vocal: M en C Liz Medina Reyes.

Secretario: M en C Luis García Aguirre.

Primer suplente: M en C María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz.

Segundo suplente: M en C Manuel Morales Hernández.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR:

Dra. Helgi Jung Cook _____

SUSTENTANTE:

Lic. Ruth M. Ruiz Vásquez _____

A la memoria de mi padre.

A mi madre por ser lo más grande y más hermoso que me dio la vida, por su infinito amor, por enseñarme a luchar y perseverar para alcanzar mis metas ¡QUE DIOS TE BENDIGA!.

A tí Rosa, mi alma gemela, gracias por todo. Gracias por ser como eres, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por motivarme a seguir adelante aún sabiendo lo difícil y doloroso de una ausencia tan prolongada. Dios me premio teniéndote a ti tal vez sin merecerlo, nuestra relación va más allá de una simple hermandad, existe un lazo que nos une el cual nada ni nadie podrá separar.

A tía Thelma y compañía mil gracias por su apoyo y su amor incondicional ¡Que Dios los bendiga!

A Chelita por su amistad incondicional, por los bellos momentos compartidos y por los que vendran ; por ser un miembro más de nuestra familia. Siempre he pensado que los amigos se cuentan con los dedos de la mano y cuando se tiene la dicha de encontrar uno debemos cultivar esa amistad cada día más para que florezca al pasar de los años.

A mis amigos mexicanos que me hicieron sentir como en casa haciendo más placentera mi estadía en este hermoso país. ¡Gracias! Mi casa es su casa.

A la Caja Costarricense de Seguro Social por el permiso otorgado para la realización de estos estudios.

A la Secretaría de Relaciones Exteriores por la beca otorgada para la realización de estos estudios.

"TE PRESTARE POR UN TIEMPO A TUS PADRES"

Te prestaré por un tiempo unos padres para que los ames mientras vivan. Podrán ser 10, 20, 30 años o más, hasta que los llame Te pregunto:

¿Podrás cuidarlos? Quiero que aprendas a vivir con ellos, les he buscado unos hijos y te he elegido a ti. No te ofrezco que se quedarán contigo para siempre, sólo te los presto. Ellos te darán ternura y te darán alegría por tenerte. El día que los llame no llorarás ni me odiarás porque los regresé a Mí. Su ausencia corporal quedará compensada por el amor y por los muchos y agradables recuerdos. Ten presente que si algo te entristece, que si el golpe del dolor te hiere algún día, tu pena es mía, y así, con todo esto, tu luto será mas llevadero y habrán de decir con agradecida humildad:

¡HAGASE, SEÑOR, TU VOLUNTAD!

EN PAZ

Muy cerca de mi ocaso
yo te bendigo, vida,
porque nunca me diste ni esperanza fallida.
ni trabajos injustos, ni pena inmerecida.

Porque veo, al final de mi rudo camino,
que yo fui el arquitecto de mi propio destino.

Que si extraje las mieles o la hiel de las cosas,
fue porque en ellas puse hiel o mieles sabrosas;
cuando planté rosales, coseché siempre rosas.

Cierto, a mis lozanías va a seguir el invierno,
mas tú no me dijiste que mayo fuese eterno.

Hallé sin duda largas las noches de mis penas,
mas no me prometiste tú sólo noches buenas,
y, en cambio, tuve algunas santamente serenas...

Amé, fui amado, el sol acarició mi faz.

Vida, nada me debes!
Vida, estamos en paz!

Amado Nervo

SI EL MAÑANA NUNCA LLEGA...

Si supiera que hoy fuera la última vez que te voy a ver dormir, te abrazaría fuertemente y rezaría al Señor para poder ser el guardián de tu alma.

Si supiera que esta fuera la última vez que te vería salir por la puerta, te daría un abrazo, un beso y llamaría de nuevo para darte más.

Si supiera que esta fuera la última vez que voy a oír tu voz, grabaría cada una de tus palabras para poder oír una y otra vez indefinidamente.

Si supiera que estos son los últimos minutos que te vería, diría te quiero y no asumiría, tontamente, que ya lo sabes.

Siempre hay un mañana y la vida nos da otra oportunidad para hacer las cosas bien, pero por si me equivoco y hoy es todo lo que nos queda, me gustaría decirte cuanto te quiero y que nunca te olvidaré.

El mañana no le esta asegurado a nadie, joven o viejo. Hoy puede ser la última vez que veas a los que amas. Por eso no esperes más, hazlo hoy, ya que si mañana nunca llega, seguramente lamentarás el día que no tomaste tiempo para una sonrisa, un abrazo, un beso, y que estuviste muy ocupado para concederle a alguien un último deseo.

Mantén a los que amas cerca de ti, diles al oído lo mucho que los necesitas, quiérelos y trátalos bien, toma tiempo para decirles lo siento, perdóname, por favor, gracias y todas las palabras de amor que conoces.

Así, si mañana nunca llega, no tendrás remordimientos por hoy.

"Nadie te recordará por tus pensamientos secretos. Pide al Señor la fuerza y sabiduría para expresarlos"

INDICE

RESUMEN

CAPITULO I: INTRODUCCION 2

CAPITULO II: GENERALIDADES

2.1 Antecedentes	5
2.2 Monografía de ketoconazol	9
2.2.1 Propiedades Fisicoquímicas	9
2.2.2 Mecanismos de acción	10
2.2.3 Farmacocinética	12
2.2.3.1 Absorción	12
2.2.3.2 Distribución	13
2.2.3.3 Metabolismo	14
2.2.3.4 Eliminación	15
2.2.3.5 Precauciones	16
2.2.3.6 Indicaciones	16
2.2.3.7 Dosis	17
2.2.3.8 Efectos secundarios	17
2.2.3.9 Interacciones	18
2.3 Metodología Analítica	20

CAPITULO III: PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Método analítico para la cuantificación del Ketoconazol en plasma	23
3.1.1 Material y equipo	23
3.1.2 Reactivos	23
3.1.3 Estándares	24
3.1.4 Soluciones	24
3.1.5 Preparación de los estándares de referencia	24
3.1.6 Preparación de la curva patrón de ketoconazol	24
3.1.7 Preparación de las muestras	25
3.1.8 Condiciones cromatográficas	25
3.2 Validación del método analítico	27
3.2.1 Linealidad	27
3.2.1.1 Linealidad del Sistema	27
3.2.1.2 Linealidad del Método	27
3.2.2 Especificidad	27
3.2.3 Repetibilidad	28
3.2.4 Por ciento de recobro	28
3.2.5 Exactitud	28
3.2.6 Límite de cuantificación	29

3.3 Estudio "in vivo"	29
3.3.1 Número de voluntarios	29
3.3.2 Análisis clínicos	29
3.3.3 Criterios de inclusión	30
3.3.4 Criterios de exclusión	30
3.3.5 Horario de toma de muestras y conservación	31

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Validación del método analítico para la cuantificación de ketoconazol en plasma	33
4.1 Linealidad	33
4.1.1 Linealidad del Sistema	33
4.1.2 Linealidad del método	34
4.1.3 Especificidad	36
4.1.4 Repetibilidad y reproducibilidad (precisión)	38
4.1.5 Por ciento de recobro	39
4.1.6 Por ciento de exactitud	40
4.1.6 Limite de cuantificación	40
4.2 Estudio farmacocinético en voluntarios sanos	41
4.2.1 Análisis de parámetros farmacocinéticos	43

<i>CAPITULO V: CONCLUSIONES</i>	46
--	----

<i>CAPITULO VI: APENDICE</i>	48
-------------------------------------	----

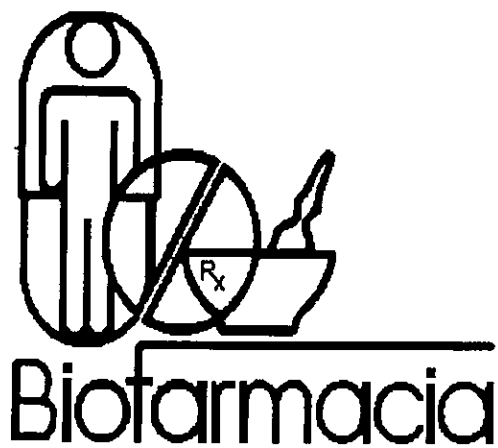
<i>CAPITULO VII: BIBLIOGRAFIA</i>	50
--	----

LISTA DE FIGURAS

Fig 1.1 Estructura de ketoconazol	9
Fig 1.2 Mecanismo de acción de ketoconazol	11
Fig 3.1 Diagrama de método analítico para la cuantificación de ketoconazol en plasma	26
Fig 4.1 Linealidad del sistema para la cuantificación de ketoconazol en plasma	33
Fig 4.2 Linealidad del método analítico para la cuantificación de ketoconazol en plasma	35
Fig 4.3 Cromatogramas representativos	37
Fig 4.4 Concentración plasmática promedio de ketoconazol ug/mL +D.S	42
Fig 4.5 Logaritmo de la concentración plasmática promedio de ketoconazol en plasma	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Linealidad del sistema para la cuantificación de ketoconazol en plasma	34
Tabla 2 Linealidad del método analítico para la cuantificación de ketoconazol en plasma	35
Tabla 3 Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de ketoconazol en plasma	38
Tabla 4 Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de ketoconazol en plasma	39
Tabla 5 Por ciento de recobro del método analítico para cuantificar ketoconazol en plasma	39
Tabla 6 Porcentaje de exactitud para la cuantificación de ketoconazol en plasma	40
Tabla 7 Concentración plasmática promedio del ketoconazol ug/mL \pm D.E en voluntarios sanos	41
Tabla 8 Parámetros farmacocinéticos individuales para cada voluntario	43
Tabla 9 Concentración plasmática de ketoconazol en los diferentes tiempos de muestreo para cada voluntario	44



I. INTRODUCCION

INTRODUCCION

La medida tanto de la cantidad como de la velocidad con que un fármaco (inalterado) llega a la circulación general a partir del medicamento en que fue administrado se denomina biodisponibilidad.

Un estudio de bioequivalencia es aquel que permite establecer si dos formulaciones distintas, de una misma forma farmacéutica, presentan la misma biodisponibilidad. Un producto en proceso de registro deberá ser bioequivalente a aquél que contiene la misma dosis del ingrediente activo, en la misma forma farmacéutica y que previamente ha sido aprobado y se encuentra en el mercado ⁽¹⁾.

En 1998 se aprobó la **Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998** la cual establece las pruebas y requerimientos para demostrar la bioequivalencia entre dos productos de tal forma que puedan ser registrados en el país.

Se dice que dos formulaciones son bioequivalentes cuando son equivalentes químicos o farmacéuticos que presentan una biodisponibilidad comparable cuando se administran a los mismos individuos, bajo el mismo régimen de dosificación.

Dado el gran auge que han tenido los genéricos en el mercado mexicano se hace necesario establecer protocolos de bioequivalencia para dichos productos, de tal forma que se garantice un producto de calidad al paciente.

En México se cuenta con una gran variedad de antimicóticos tanto de administración oral como tópica o intravenosa, entre ellos el ketoconazol, con un tiempo de vida media de aproximadamente dos horas; el cual es el antimicótico oral de elección para diferentes

INTRODUCCION

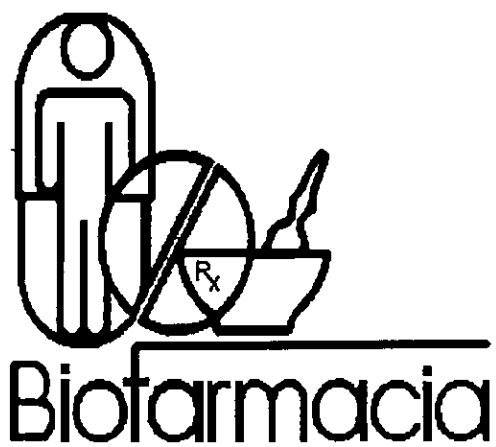
tipos de micosis, entre ellas: blastomicosis, onicomycosis, esporotricosis diseminada, neumonía fúngica, etc.

Dado el interés de llevar a cabo estudios de bioequivalencia del ketoconazol se decidió realizar un estudio piloto administrando únicamente el producto innovador (Nizoral) y determinar si los tiempos de muestreo propuestos eran los adecuados.

En base a lo anterior los objetivos del estudio fueron:

- Determinar los parámetros farmacocinéticos del ketoconazol en la población mexicana.

- Diseñar un protocolo para realizar estudios de bioequivalencia de productos conteniendo ketoconazol.



II. GENERALIDADES

2.1 Antecedentes

Los hongos son microorganismos de estructura celular eucariótica, simples y de gran adaptabilidad a diversos ambientes.

En la naturaleza existen alrededor de 100.000 especies de hongos, de las cuales unas 200 son potencialmente patógenas para el hombre y los animales, y muy pocas tienen un poder patógeno primario. La resistencia natural a la infección micótica es alta, de ahí que, en el proceso infeccioso, es muy importante el inóculo, así como el estado general del huésped ⁽²⁾.

El mecanismo básico de patogenicidad de los hongos radica en su capacidad de adaptación al nuevo ambiente, lo cual logran, en gran medida, mediante el dimorfismo, que les posibilita una mayor actividad metabólica, con una multiplicación y un crecimiento más rápidos.

Los hongos se destacan no solo por su capacidad para parasitar en seres vivos, sino que algunos de ellos son productores de antibióticos, en otros los productos de su metabolismo son importantes en la industria ⁽²⁾.

Las micosis son desencadenadas por factores intrínsecos y extrínsecos, entre estos destacan ⁽³⁾:

A) Factores intrínsecos

- Hormonales: Síndrome de Cushing
- Fisiológicos: Embarazo
- Metabólicos: Diabetes mellitus, uremia.
- Enfermedades sistémicas: Neoplasias, leucemia, tuberculosis, desnutrición.

GENERALIDADES

B) Factores extrínsecos

- Terapéuticos: Corticosteroides, inmunosupresores, antibióticos de amplio espectro, citostáticos.
- Quirúrgicos: Viscerotomías, trasplantes de tejidos, cirugía cardíaca.
- Otros: Aplicación de catéteres, venoclisis, exceso de humedad local, drogadicción.

Los microorganismos fúngicos son seres de organización eucariota, desprovistos de clorofila, heterótrofos, unicelulares, y más típicamente filamentosos, con paredes celulares quitinosas o de otros carbohidratos complejos, que se nutren por absorción. Usualmente presentan tipos de reproducción tanto sexual como asexual, y su propagación típica es por medio de esporas que se pueden producir en diferentes tipos de aparatos esporíferos ⁽⁴⁾.

La piel es el principal lugar de localización de las infecciones micóticas en el hombre, siendo conveniente clasificarlas en superficiales y profundas. Cuando se limitan a la piel, muchas infecciones micóticas son superficiales y están localizadas a 1-2 mm de su superficie externa. Los hongos que habitualmente no causan más que infecciones cutáneas se denominan dermatófitos, los cuales se clasifican en tres géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, estos poseen la capacidad de digerir la queratina y nutrirse de la misma ⁽⁵⁾.

Cada especie tiende a producir su propio rasgo clínico, pero a menudo varias provocarán erupciones idénticas; otras veces las erupciones son tan distintas y características, que sus rasgos clínicos permiten la identificación de las especies. Los apéndices cutáneos, a saber, el pelo y las uñas, pueden estar afectadas también de manera vital en estas infecciones.

Desde el punto de vista epidemiológico, es importante recalcar que las micosis cutáneas tienen una distribución mundial, aunque su prevalencia se ve favorecida por factores tales como los climas cálidos y húmedos. Aunque no existe una diferencia muy clara de tipo racial, parece ser que la raza negra presenta menos susceptibilidad a las infecciones por dermatofitos que la caucásica. De igual manera existen diferencias por grupos de edad, cuyo ejemplo más claro es el de la tiña capitis, la cual no se manifiesta después de la pubertad probablemente por el efecto inhibitorio del *Pitirosporum orale* cuya presencia en la edad post puberal probablemente aumenta la resistencia a esta micosis ⁽⁶⁾.

Las micosis causadas por los dermatofitos se denominan también dermatofitosis o tiña, se manifiestan de forma diferente en ciertas partes del cuerpo, y presentan rasgos distintivos característicos de la parte. Por esta razón las tiñas se dividen en: tiña de la cabeza, tiña de la barba, tiña de la cara, tiña del cuerpo, tiña de las manos, tiña de los pies, tiña inguinal y onicomicosis.

Las micosis superficiales se clasifican también según el dermatofito causante, lo cual tiene interés principalmente epidemiológico, ya que el tratamiento de estas infecciones solo en raras ocasiones se beneficia de la identificación del género y la especie del organismo causante. Su habitat ha permitido clasificarlos en especies geofílicas (residentes en los suelos), zoofílicas (originales en animales); y antropofílicas (restringidas a la especie humana). De acuerdo con esta característica de habitat, las infecciones cutáneas por hongos se presentarán cuando exista la oportunidad del contacto con el microorganismo invasor, es así como, la tiña pedis es fácilmente contraída en suelos contaminados (piscinas, baños); la tiña corporis es transmitida por animales y tiene tendencia a ocasionar reacciones altamente inflamatorias, y las micosis antropofílicas se desarrollan por el contacto directo entre niños infectados con tiña capitis, cuyas lesiones son generalmente poco inflamatorias ⁽⁷⁾.

La mayoría de las infecciones sistémicas por hongos se debe a la inhalación de polvo contaminado con el hongo, a los excrementos de animales infectados o a la

GENERALIDADES

contaminación proveniente de otras fuentes. Cuando la infección primitiva se localiza en la piel debido a heridas punzantes, abrasismos u otros traumatismos, aparece una lesión chancriforme seguida de linfangitis secundaria. En ausencia de lesión chancriforme, debe pensarse que otros nódulos y ulceraciones de la enfermedad, especialmente los bilaterales, provienen de un foco interno, habitualmente pulmonar o localizado en las vías respiratorias superiores.

Las posibilidades de recuperación espontánea son buenas cuando existe una lesión chancriforme, que indica una infección cutánea primaria. Por otra parte, el pronóstico es grave cuando las lesiones cutáneas se deben a la disminución de la enfermedad a partir de uno o más focos viscerales.

Las enfermedades causadas por hongos representan un gran problema para el hombre, por lo que se ha tratado de combatirlas empleando sustancias antimicóticas las cuales han sido descubiertas a través de los últimos 30 años.

Hasta 1951 no existía ningún agente efectivo en el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas como la coccidiomicosis, paracoccidiomicosis, histoplasmosis, micetoma, etc, lo cual ocasionó el interés de los investigadores en buscar nuevos fármacos que resultaran efectivos en el tratamiento de dichas enfermedades. En 1969 surgen los derivados sintéticos del imidazol (clotrimazol, miconazol y econazol) los cuales fueron utilizados con éxito en el tratamiento de micosis más severas y en 1977 aparece el ketoconazol, el cual fue desarrollado por los laboratorios Jansen en Bélgica y demostró ser el primer antimicótico oral de amplio espectro para ser empleado en casi todas las micosis tanto superficiales como sistémicas ⁽¹⁾.

Los antimocóticos pueden actuar como fungistáticos o fungicidas, según inhiban el crecimiento o produzcan lisis de los hongos. El ketoconazol es fungistático en bajas concentraciones o fungicida en altas, lo que esta relacionado con inhibición de la síntesis de ergosterol o daño directo a la membrana ⁽⁸⁾.

2.2 Monografía de ketoconazol ^(6,7,8,9,10,11,12)

2.2.1 Propiedades Físicoquímicas

Nombre Químico: Cis -1-acetil-4- $\{$ 4- $\{$ 2, (2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolon-4-il $\}$ metoxi $\}$ fenil $\}$ piperazina

Nombres Comerciales: Conazol, Fungofer, Fungoral, Fungosina, Micogal, Nizoral, Termizol, Nikorazol, Micosol

Fórmula Condensada: C₂₆H₂₈Cl₂N₄O₄

Fórmula Desarrollada:

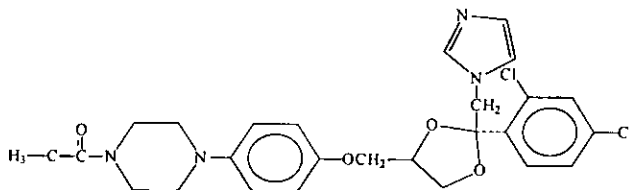


Fig. 1.1: Estructura de ketoconazol

Peso Molecular: 531.44 g/mol

Apariencia Física: Polvo blanco, inodoro y casi insípido.

Solubilidad: Soluble en cloroformo, metanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, ácido clorhídrico diluido. Insoluble en agua.

Punto de Fusión: 145-149 °C

Rotación Específica: -1 a +1 a 20 °C

Residuo de Ignición: No más de 0.1%

Pérdida al Secado: Al vacío a 80°C por 4 horas pierde no mas 0.5% de su peso.

pKa: 6.51

GENERALIDADES

El ketoconazol es un fármaco usado en el tratamiento de infecciones fúngicas. Presenta un anillo imidazol libre unido a otros anillos aromáticos por medio de una unión N-C con posición 1. Las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de las moléculas le confieren una buena penetración en el nivel de los tejidos profundos y superficiales sin mayor toxicidad ⁽³⁾. Su estructura química comprende varios anillos heterocíclicos y grupos donadores de electrones indicando que podría poseer actividad antitiroidea ^(5,7).

La acción antitiroidea de ketoconazol fue demostrada in vitro a partir de la formación del complejo con yoduro e in vivo con ensayos de l-tiroxina y la apariencia histológica de la glándula tiroides de ratas tratadas crónicamente con el fármaco ⁽¹¹⁾.

Las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de las moléculas le confieren una buena penetración en el nivel de los tejidos profundos y superficiales sin mayor toxicidad. En concentraciones fungistáticas actúa sobre los hongos patógenos. La acción del agente antifúngico, junto con los mecanismos de defensa del huésped posibilitan la eliminación de los antígenos fúngicos que, en micosis profundas o crónicas, frecuentemente son responsables del bloqueo de la inmunidad celular ⁽³⁾.

2.2.2 Mecanismos de acción

Inhibe la síntesis del ergosterol en el nivel de la membrana citoplasmática (bloquea la dimetilación en C-14 del lanosterol que es el precursor del ergosterol), se altera la permeabilidad celular, efecto muy selectivo en la medida en que es la misma célula fúngica la que debe realizar su biosíntesis de ergosterol, mientras que el colesterol de las células del organismo huésped no se ve afectado ^(3,14).

Estudios bioquímicos han demostrado que el ketoconazol afecta la permeabilidad de la membrana celular de células sensibles, lo cual se manifiesta por la entrada de iones potasio y compuestos fosforados.

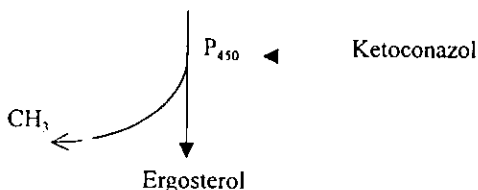


Fig.1.2: Mecanismo de acción ketoconazol

Este fármaco interfiere además con la biosíntesis de triglicéridos y los fosfolípidos de los hongos.

Estudios hechos a nivel morfológico mediante microscopía electrónica de barrido han demostrado que el ketoconazol tiene efecto sobre la biosíntesis de lípidos a bajas concentraciones (10-100 ng/mL), causando alteración de la membrana celular.

A altas concentraciones de ketoconazol (0.5-50 ug/mL), la vacuola central de la célula aumenta de tamaño y se llena de material citoplasmático degradado y de gotas de lípidos; la célula adquiere una forma angular debido a la pérdida de resistencia osmótica y concentraciones mayores de 50 ug/mL causan necrosis celular con sobrecarga de grasa.

El ketoconazol también tiene efecto sobre las enzimas oxidativas y peroxidativas de las células encontrándose que bajas concentraciones provocan la producción de peróxido de hidrógeno como consecuencia de la actividad de la oxidasa -NADH dependiente, inhibición de la actividad de la peroxidasa e incremento de la actividad de la catalasa; la cual mantiene bajos niveles de peróxido de hidrógeno intracelular, no tóxicos para la célula. Sin embargo, a concentraciones altas, la oxidasa -NADH dependiente continua produciendo peróxido de hidrógeno mientras que la actividad de la catalasa y peroxidasa se inhibe totalmente, con lo cual los niveles de peróxido de hidrógeno se incrementan a concentraciones tóxicas causando muerte celular ⁽⁶⁾.

GENERALIDADES

El ketoconazol tiene importantes ventajas con respecto a otros antimicóticos: puede ser administrado por vía oral y presenta amplia actividad antifúngica con mínimos efectos adversos ⁽⁴⁾.

2.2.3 Farmacocinética

La farmacocinética del ketoconazol depende de la dosis. La concentración plasmática máxima se alcanza entre una y dos horas según la dosis administrada. Su concentración en líquido cefaloraquídeo es alrededor de 1–2 % de la concentración sérica, lo cual confirma la débil difusión del antifúngico en este nivel y limita su empleo en casos de meningitis, principalmente criptocócica ⁽³⁾.

2.2.3.1 Absorción

El ketoconazol es un fármaco débilmente básico, por lo que requiere de pH ácido para su disolución. En sujetos normales se absorbe fácilmente después de su administración oral, aproximadamente un 75%. La administración conjunta con alimentos puede retardar su absorción pero no disminuye la cantidad total absorbida ^(15,16).

La absorción del ketoconazol en el tracto gastrointestinal es variable, se incrementa al disminuir el pH ⁽¹⁷⁾.

Su absorción es buena y se aumenta si se administra antes de las comidas. Su solubilidad se acrecienta en medios ácidos y ricos en grasas. Algunas condiciones que pueden interferir en la biodisponibilidad son aclorhidria y tratamientos con antiácidos.

Brass et al; encontró que no hay una disminución significativa en el área bajo la curva promedio cuando dosis únicas de ketoconazol son tomadas con antiácidos por lo que

GENERALIDADES

todos los fármacos que reducen la acidez gástrica también reducen la absorción del ketoconazol ⁽¹⁸⁾.

La absorción del ketoconazol está disminuida en falla renal, trasplante de médula ósea, enfermedades hematológicas y síndrome de mala absorción ⁽¹⁹⁾.

Su aplicación tópica no produce absorción sistémica. Después de la aplicación de ketoconazol crema al 2% en piel afectada por tiña pedis, no se detectan concentraciones en plasma ⁽¹⁹⁾.

Se ha encontrado que la concentración plasmática promedio es de 4.5 ug/mL dos horas después de la administración de una dosis de 200 mg de ketoconazol ⁽¹⁷⁾.

2.2.3.2 Distribución

La distribución del ketoconazol varía de acuerdo al tejido de muestra, conocimiento de la enfermedad, dosis y duración del tratamiento.

No alcanza concentraciones adecuadas en orina y líquido cefalorraquídeo. Los niveles terapéuticos son mayores 1 ug/mL. La dosis usual es de 200 mg/día, la cual puede duplicarse e incluso, llevarse hasta 600 y 800 mg/día sin peligro alguno en la mayoría de los casos ⁽³⁾.

Las concentraciones de ketoconazol en fluido cerebro espinal para meningitis fúngica son de 0.05 ug/mL – 1.65 ug/mL en fluido ventricular y lumbar con una dosis de 800 – 1200 mg por día. La penetración promedio de ketoconazol fue de 1.9% para fluido ventricular y 5.4% para fluido lumbar; las concentraciones de ketoconazol en fluido cerebro espinal varían directamente con el contenido de proteínas tanto en el mismo fluido como en suero ⁽²⁰⁾.

GENERALIDADES

En sujetos sanos se obtienen concentraciones de ketoconazol en saliva de 0.15 mg/mL dos horas después de una dosis de 600 mg vía oral por lo que su distribución en saliva es poca ⁽¹⁵⁾.

Se distribuye al líquido de las articulaciones inflamadas, saliva, bilis, orina, secreción sebácea, cerumen, heces, tendones, tejidos blandos, piel, testículos, atraviesa la barrera hematoencefálica en muy pequeña proporción por lo que en el líquido cefarraquídeo se encuentran cantidades despreciables. Su volumen de distribución es de 2.4 L/Kg. Los niveles plasmáticos máximos se alcanzan aproximadamente en 1 o 2 horas después de su administración. Presenta dos vidas medias una inicial de distribución de 2 h y una terminal, de eliminación de 8 horas ^(4,21,22,23).

En la sangre solo un 1% de ketoconazol esta presente como fármaco libre en el agua plasmática, un 83.7% se encuentra unido a las proteínas plasmáticas (principalmente la albúmina) y un 15.3% a las células sanguíneas. Dentro de las células rojas el ketoconazol se encuentra unido un 84% a las membranas de las células y un 16% a los constituyentes celulares, probablemente la hemoglobina ⁽¹⁵⁾.

2.2.3.3 Metabolismo

El ketoconazol se metaboliza extensamente a un gran número de metabolitos inactivos principalmente por oxidación y degradación de los anillos de imidazol y piperazina, o desalquilación oxidativa e hidroxilación aromática. Ninguno de los metabolitos identificados posee actividad antifúngica ^(6,23,15).

GENERALIDADES

2.2.3.4 Eliminación

Después de su administración oral el ketoconazol puede sufrir efecto de primer paso. Las concentraciones máximas después de una dosis oral en ratones muestran un incremento desproporcionado de los niveles en suero con un incremento de la dosis. En humanos, se observó un incremento similar en el área bajo la curva después de dosis de 100, 200, 400, 600 y 800 mg, lo cual implica una saturación de la capacidad metabólica hepática ⁽¹⁵⁾.

El ketoconazol tiene una vida media dosis dependiente, la cual se incrementa con un incremento en la dosis y después de dosis repetidas.

Después de la administración de una dosis oral de 200 mg la vida media oscila en el rango de 1.5 – 4 horas ⁽²⁵⁾. A dosis mayores de 400 mg se han reportado vidas medias de 2.2 y 2.7 horas. Pacientes con cáncer a quienes se les administró una dosis de 400 – 800 mg/día presentaron una vida media promedio de 3.7 horas (con un rango entre 1.3 – 11.6h) ⁽²⁶⁾.

El ketoconazol se excreta en heces en forma de metabolito y como fármaco inalterado en diferentes proporciones. En las ratas el 60% de la dosis se excreta por la bilis (como metabolitos con actividad antifúngica) durante los primeras 24 horas. En humanos la excreción urinaria es pequeña, Maksymiuk et al reportó en 1982 pacientes con enfermedades malignas avanzadas en los cuales menos del 1% de la dosis administrada se recuperó en la orina al cabo de 6 horas ⁽²⁴⁾.

2.2.3.5 Precauciones

Embarazo. El Ketoconazol atraviesa la placenta. Se ha demostrado que es embriotóxico en ratas a las cuales se les administraron dosis mayores a 80 mg/kg durante el primer trimestre ⁽¹⁷⁾.

Lactancia. El ketoconazol se excreta en la leche materna y puede aumentar la posibilidad de kernicterus ^(27,16).

Pediatría. Se han descrito varios casos de hepatitis en niños. No se ha establecido su uso en niños menores de dos años ⁽²⁸⁾

2.2.3.6 Indicaciones

Blastomicosis pulmonar y diseminada, candidiasis mucocutánea crónica, tinea cruris, tinea pedis, tinea versicolor, tinea corporis, histoplasmosis, coccidiomicosis, paracoccidiomicosis, onicomycosis, neumonía fúngica, septicemia fúngica, esporotricosis diseminada, infecciones fúngicas del tracto urinario, infecciones fúngicas de la vejiga urinaria, cromomicosis, candiduria. También es efectivo contra dermatofitos ⁽²⁹⁾.

Se ha usado en pacientes inmunocomprometidos para prevenir la colonización o infecciones fúngicas ⁽²⁷⁾.

El ketoconazol ha sido efectivo en el tratamiento de algunas infecciones dérmicas que no han respondido a griseofulvina oral. También ha sido usado en el tratamiento de candidiasis vulvo vaginal en mujeres no embarazadas ⁽³⁰⁾.

GENERALIDADES

2.2.3.7 Dosis

Antifúngico ⇒ Hasta 1 gr diario

Dosis pediátrica ⇒ 3.3 – 6.6 mg/kg/día

Adultos y niños con peso mayor de 40 kg ⇒ inicialmente 200 mg en dosis única diaria.

La dosificación puede aumentar hasta 400 mg por día en pacientes que no responden.

Para el tratamiento de dermatofitosis se administran 200 mg al día durante 4 a 8 semanas, excepto en tiña de la cabeza y en onnicomicosis; en la primera sólo se recomienda si hay intolerancia a griseofulvina y en pacientes inmunocomprometidos, pues en general la acción de este fármaco es muy lenta en ésta localización (tiña cabeza), en uñas de las manos se debe administrar un promedio de seis meses, y en las de los pies, cuando menos un año.

Es muy eficaz en cualquier forma clínica de candidosis, la duración del tratamiento varía de dos a seis semanas según la localización; en vaginitis se recomiendan 200 – 400 mg al día por cinco días. Se administra por tiempo prolongado en candidosis mucocutánea crónica y formas profundas o sistémicas. En pitiriasis versicolor se administran 200 mg al día de 10 – 30 días según la gravedad y extensión ^(12,31).

2.2.3.8 Efectos secundarios

Los principales efectos secundarios que se han reportado son : gastrointestinales, 70%; náuseas y vómitos; dolor abdominal, 3%; diarrea, 1.3%; prurito; erupciones cutáneas, 1.7%; fotosensibilidad, mareos, somnolencia, elevación asintomática de enzimas hepáticas o hepatotoxicidad en 1 de 10000 a 15000 enfermos, esta reacción se ha considerado idiosincrática y aumenta sobre todo cuando el tratamiento dura más de 7 semanas ^(23,29,32).

GENERALIDADES

En algunos casos se han reportado efectos endocrinos, en particular antiandrógenos por inhibición de la síntesis de testosterona: ginecomastia, disminución de la libido, oligospermia e impotencia ^(33,5).

La toxicidad gastrointestinal o endocrina esta relacionada con la dosis, la cual incrementa significativamente con dosis mayores 800 mg/día ⁽³⁴⁾.

Otros autores reportan palpitaciones, anemia y, con dosis mayores a 400 mg, disminución en la producción de colesterol o interferencia en la de hormonas adrenocorticotrópicas.

2.2.3.9 Interacciones

Las principales interacciones que se han encontrado son las siguientes:

Ciclosporina: El ketoconazol disminuye el metabolismo intestinal de ciclosporina por lo tanto aumenta las concentraciones plasmáticas de la misma e incrementa el riesgo de nefrotoxicidad ^(28,35,36,37).

Antihistamínicos: Pueden aumentar el pH gastrointestinal dando lugar a una reducción en la absorción del ketoconazol ^(17,38).

Fenitoína: Se pueden alterar las concentraciones plasmáticas de ambos fármacos. El tiempo para alcanzar las concentraciones séricas máximas de ketoconazol se puede ver aumentado, la respuesta de ambos medicamentos debe ser monitoreada ⁽¹⁷⁾.

Isoniazida, anfotericina: Puede dar lugar a un descenso significativo de las concentraciones séricas de ketoconazol ⁽²⁷⁾.

Antiácidos-anticolinérgicos: Disminuyen la absorción de ketoconazol. Esperar cuando menos dos horas después de la dosis de ketoconazol antes de administrar estos fármacos ⁽²¹⁾.

Hipoglicemiantes: El efecto hipoglicemiante se ve aumentado ⁽²⁸⁾.

GENERALIDADES

Anticoagulantes: Aumenta el efecto anticoagulante, por ejemplo derivados de la cumarina o de la indandiona ⁽²⁷⁾.

Astemizol: El ketoconazol inhibe el metabolismo del astemizol por lo que aumenta el riesgo de cardiotoxicidad ⁽¹⁷⁾.

Rifampicina: Aumenta el metabolismo de ketoconazol por lo que hay un descenso significativo de las concentraciones séricas del mismo ⁽²⁷⁾.

Alcohol: Aumenta incidencia de hepatotoxicidad, puede producir reacción tipo disulfiran ^(30,39).

Triazolam: El efecto hipnótico se prolonga. Asimismo la presión arterial disminuye y aumenta el área bajo la curva del triazolam ^(40,41,42,43).

Sucralfato: Disminución de 20.2% en la biodisponibilidad del sucralfato ^(44,45,46).

Clordiazepóxido: El ketoconazol disminuye la depuración de clordiazopóxido en un 20% y el volumen de distribución en un 26% ^(17,3,47).

Metilprednisolona: Aumenta el área bajo la curva de metilprednisolona y disminuye su depuración ^(17,48,49,50,51).

Zolpidem: Disminuye la depuración del mismo y aumenta el efecto agonista farmacodinámico parecido a las benzodiazepinas ⁽⁵²⁾.

Carbamazepina: Aumenta 29% concentraciones plasmáticas de carbamazepina ⁽⁵³⁾.

Antipirina: El ketoconazol inhibe el metabolismo oxidativo de la antipirina por lo que se presenta un aumento en el tiempo de vida media y su depuración disminuye ⁽⁵⁴⁾.

2.3 Metodología Analítica

Para la cuantificación del ketoconazol en plasma los métodos más empleados son los de cromatografía de líquidos de alta resolución, siendo los más sensibles aquellos en los que se emplea detector de fluorescencia ⁽⁵⁵⁾

El primer método de CLAR fue reportado por Alton en 1980 ⁽⁵⁶⁾, en el cual después de la extracción del fármaco en plasma el compuesto es separado usando una columna de fase reversa y detector ultravioleta de 205nm.

Swezey ⁽⁵⁷⁾ y colaboradores reportan un método con detector de fluorescencia con una extracción simplificada en el cual usan un análogo de ketoconazol como estándar interno (longitud de onda de excitación 206 nm y de emisión 370 nm).

En 1984 Badcock ⁽⁵⁸⁾ reporta un método para el monitoreo terapéutico de ketoconazol en neonatos, en el cual solo se utilizan 20 uL de suero e involucra una precipitación de proteínas con acetonitrilo seguido de centrifugación e inyección directa del supernadante.

Pascussi et al ⁽⁵⁵⁾ describe una preparación simplificada de la muestra empleando cartuchos fase reversa C-18 y fenotiazina como estándar interno, así como detector fluorescente.

En 1986 Riley y colaboradores ⁽⁵⁹⁾ reportan un método para determinar ketoconazol en plasma, hígado y pulmón de rata un detector ultravioleta a 254 nm, el cual no es aplicable a métodos anteriores.

<i>Método Analítico para Cuantificar Ketoconazol por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución</i>			
<i>Determinación</i>	<i>Método</i>	<i>Detección</i>	<i>Referencia</i>
Keto	CLAR plasma	UV 205 nm	56
Keto	CLAR plasma	Fluorescencia	57
Keto	CLAR plasma	Fluorescencia	55
Keto	CLAR Plasma, suero	UV 240 nm	58
Keto	CLAR Plasma, hígado, pulmón	UV 254 nm	59



III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Método analítico para la cuantificación del Ketoconazol en plasma

El método analítico utilizado para la cuantificación de ketoconazol en plasma fue el método por cromatografía de líquidos de alta resolución, reportado por V.L Pascucci, J. et al. con algunas modificaciones ⁽⁴⁴⁾

3.1.1 Material y equipo

- ◆ Balanza analítica OHAUS modelo AS120S
- ◆ Centrifuga automática Superspeed SS-3 tipo 663
- ◆ Agitador vortex Genie modelo K-550
- ◆ Micropipeta eppendorff de 10 a 100 μ L, 100 a 1000 μ L y de 1000 a 5000 μ L
- ◆ Baño de agua con temperatura OAKTON pH/mv/ $^{\circ}$ C serie 35617
- ◆ Ultrasonido Cole Parmer modelo 8890
- ◆ Cartuchos Sep-Pak, Waters Assoc., de fase reversa C-18
- ◆ Manifold para extracción fase reversa Waters C-18.
- ◆ Cromatógrafo de líquidos de Alta Resolución Milenium, equipado con:
 - ◆ Detector de fluorescencia 474
 - ◆ Inyector manual modelo 7725
 - ◆ Bomba modelo 510
 - ◆ Loop de inyección de 100 μ L

3.1.2. Reactivos

- ◆ Hidróxido de sodio R.A (Baker, lote 3724-01).
- ◆ Fosfato de sodio monobásico R.A. (Baker, lote 7892).
- ◆ Metanol R.A (Baker, lote UN-1230).
- ◆ Metanol HPLC (Baker, lote 9093-03).
- ◆ Agua destilada, desionizada y filtrada.
- ◆ Plasma humano libre de pirógenos y certificado de pruebas de VDRL, VIH, factor Rh y grupo sanguíneo, donado por el INNN.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1.3. Estándares

- ◆ Estándar secundario de ketoconazol proveedor Chemo Ibérica 99.152% de pureza
- ◆ Estándar secundario de butilparabeno (estándar interno).

3.1.4. Soluciones

- ◆ *Solución de hidróxido de sodio 0.1 N.* Pesar 0.4 g de hidróxido de sodio R.A., disolver y aforar a 100 mL con agua destilada.
- ◆ *Solución de fosfato monobásico de sodio 0.02 M.* Pesar 1.38 g de fosfato monobásico de sodio R.A., disolver y aforar a 500 mL con agua grado CLAR.

3.1.5 Preparación de los estándares de referencia

- ◆ *Solución estándar de ketoconazol en metanol.* Pesar con exactitud 1.0 mg de ketoconazol, disolver y aforar a 10 mL con metanol CLAR para obtener una concentración de 100 µg/mL.
- ◆ *Solución estándar de butilparabeno en metanol.* Pesar con exactitud 1.0 mg de butilparabeno, disolver y aforar a 10 mL con metanol CLAR para obtener una concentración de 100 µg/mL.

3.1.6 Preparación de la curva patrón de ketoconazol

- ◆ De la solución de 100 µg/mL tomar 1 mL y aforar a 10 mL con metanol o plasma (conc. 10 µg/mL).
- ◆ De la solución de 100 µg/mL tomar 500 µL y aforar a 10 mL con metanol o plasma (conc. 5 µg/mL).
- ◆ De la solución de 100 µg/mL tomar 250 µL y aforar a 10 mL con metanol o plasma (conc. 2.5 µg/mL).
- ◆ De la solución de 100 µg/mL tomar 125 µL y aforar a 10 mL con metanol o plasma (conc. 1.25 µg/mL).

- ◆ De la solución de 100 µg/mL tomar 62.5 µL y aforar a 10 mL con metanol o plasma (conc. 0.625 µg/mL).
- ◆ De la solución de 100 µg/mL tomar 30 µL y aforar a 10 mL con metanol o plasma (conc. 0.30 µg/mL).

3.1.7 Preparación de las muestras

En un tubo de plástico de 1.5 mL colocar 500 µL de plasma, adicionar 125 µL de la solución de estándar interno (100 µg/mL) y 125 µL de hidróxido de sodio 0.1 N, agitar en vortex por espacio de 10 s. La muestra se hace pasar por un cartucho Sep-Pack C-18 (previamente activado con 2 mL de metanol R.A. y 5 mL de agua desionizada), se lava con 30 mL de agua desionizada y se eluye con 2 mL de metanol R.A, el cual se evapora en baño maría bajo corriente de nitrógeno a 40 °C. El residuo se reconstituye con 250 µL de metanol:agua (50:50) y se inyectan 50 µL al sistema cromatográfico.

3.1.8 Condiciones cromatográficas

- ◆ Columna Spherisorb C-18 octadecilsilano de 250 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5µ.
- ◆ Fase móvil: metanol-solución de fosfato de sodio 0.02 M (75:25) pH 7.
- ◆ Velocidad de flujo 1 mL/min.
- ◆ Temperatura ambiente.
- ◆ Longitud de onda de emisión 206 nm.
- ◆ Longitud de onda de excitación 370 nm.
- ◆ Tiempo de corrida 11 min.

En la figura 3.1 se presenta el diagrama del método utilizado

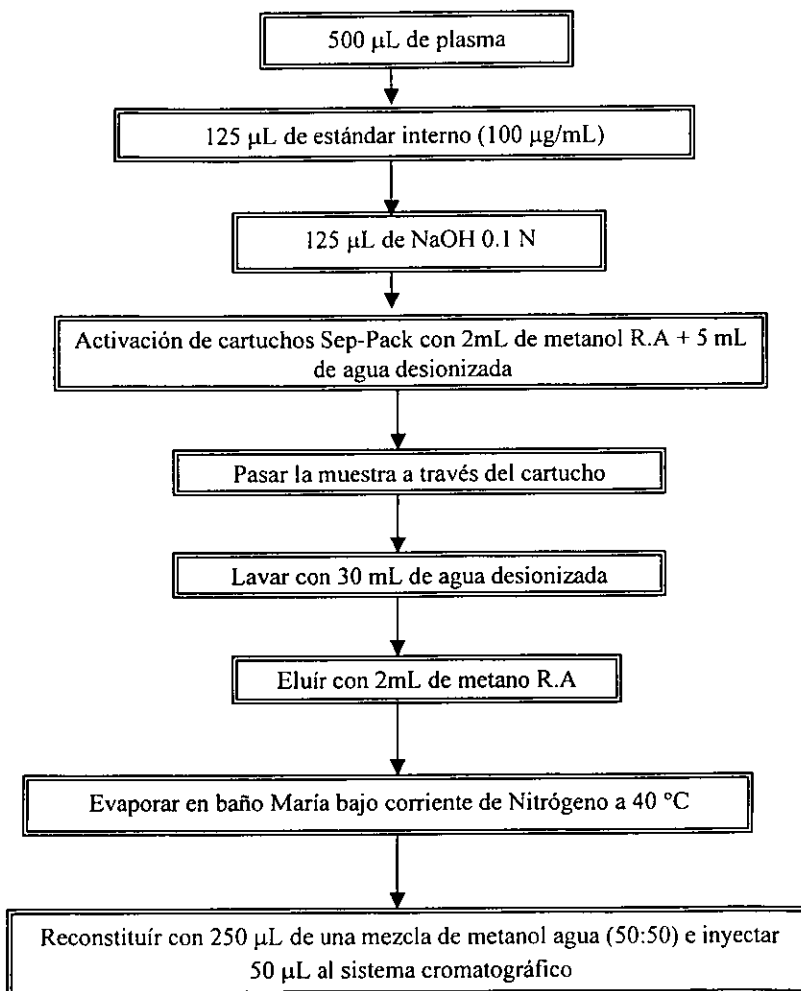


FIGURA 3.1
DIAGRAMA DE METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE
KETOCONAZOL EN PLASMA

3.2 Validación del método analítico

3.2.1 Linealidad

3.2.1.1 Linealidad del Sistema

Para determinar la linealidad del sistema se prepararon tres curvas patrón de ketoconazol en metanol en el intervalo de concentraciones de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$. Se graficó la relación de alturas (keto/E.I.) contra la concentración del fármaco. Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación (r), la pendiente (b) y la ordenada al origen (a).

3.2.1.2 Linealidad del Método

La linealidad del método se determinó preparando tres curvas patrón en plasma en el intervalo de concentraciones de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$. Se graficó la relación de alturas (keto/E.I.) contra la concentración del fármaco. Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación (r), la pendiente (b) y la ordenada al origen (a).

3.2.2 Especificidad

Se debe demostrar la especificidad del método con el fin de establecer si existen interferencias debidas a:

- i. Sustancias endógenas en la muestra biológica
- ii. Metabolitos conocidos del analito
- iii. Fármacos co-administrados y sus metabolitos

La especificidad del método se determinó probando la no interferencia de la matriz biológica (plasma) y algunos fármacos como ácido acetil salicílico y acetaminofen, en la cuantificación de ketoconazol y su estándar interno. Para llevarlo a cabo se trabajaron de

PARTE EXPERIMENTAL

forma independiente y por duplicado, muestras de blanco de plasma, así como muestras en plasma conteniendo ácido acetil salicílico y acetaminofen.

3.2.3 Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad del método analítico en el mismo día bajo condiciones idénticas de laboratorio, se prepararon tres curvas de calibración de ketoconazol en plasma en el intervalo de concentraciones de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$ según el procedimiento descrito en 3.1.6. La repetibilidad del método analítico en días diferentes se determinó analizando 6 curvas de calibración en dos días diferentes, obteniéndose el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación tanto intra como inter día para cada concentración.

3.2.4 Por ciento de recobro

Para determinar el porcentaje de recobro del método se prepararon tres curvas patrón tanto en plasma como en solución, en el intervalo de concentraciones de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras plasmáticas se procesaron de acuerdo a procedimiento descrito en 3.1.7. y la respuesta obtenida se comparó con la obtenida del análisis de las muestras en solución, obteniéndose de esta manera el porcentaje promedio de extracción para cada concentración así como el coeficiente de variación.

3.2.5 Exactitud

El porcentaje de exactitud se determinó mediante el promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad

3.2.6 Límite de cuantificación

El límite mínimo de cuantificación se estableció como aquella concentración mínima de ketoconazol en el intervalo de trabajo que puede ser cuantificada con exactitud y precisión bajo condiciones normales de operación.

3.3 Estudio “in vivo”

3.3.1 Número de voluntarios

Se realizó un estudio preliminar en el que participaron 8 voluntarios sanos con edades comprendidas entre 18 y 23 años a los cuales se les administró una dosis de 200 mg de ketoconazol. Los sujetos se encontraban en buen estado de salud lo cual se estableció con base en su historial médico.

3.3.2 Análisis clínicos

Los análisis realizados a los sujetos fueron: examen físico completo, electrocardiograma, química sanguínea, biometría hemática, examen general de orina, VDRL, detección del virus de hepatitis y VIH.

Los sujetos que participaron en el estudio fueron informados con relación al protocolo a utilizar y dieron su consentimiento por escrito, cuyo formato se encuentra en el apéndice No. 1.

3.3.3 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Voluntarios sanos, del sexo masculino o femenino, de nacionalidad mexicana, con edades entre 18 y 40 años y con un peso corporal que deberá estar entre 50 a 90 kg o bien con un índice de masa corporal inferior a 32.
- Participar de manera voluntaria de acuerdo con los lineamientos propuestos en la Ley General de Salud y obtener su consentimiento informado de acuerdo a la ley antes señalada. Asimismo, se mantendrán los lineamientos señalados por la Declaración de Helsinki, la Revisión de Japón y las Buenas Prácticas Clínicas. (Apéndice 1)
- Los voluntarios no deben haber consumido ningún fármaco, por lo menos dos semanas previas al estudio, asimismo, no se permite el consumo de café o tabaco por lo menos 48 horas antes del estudio y durante el mismo.
- Presentarse en ayuno de 12 horas previo al estudio.

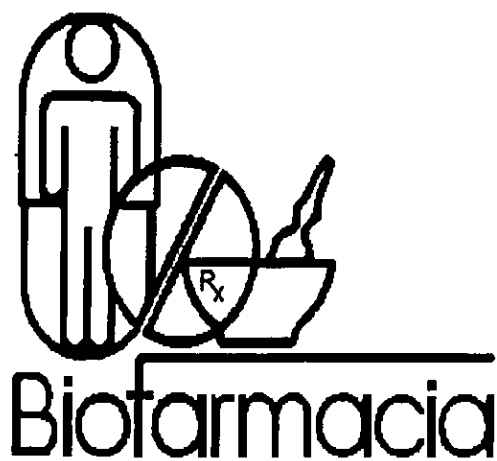
3.3.4 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Sujetos a los que se les encuentre alguna alteración en sus constantes vitales registradas en la selección de voluntarios.
- Se excluirá todo aquel voluntario que no cumpla con los criterios de inclusión propuestos.
- Sujetos alérgicos a ketoconazol o que estén tomando cisaprida, astemizol, o derivados de las eritromicinas.
- Sujetos que presenten trastornos gastrointestinales, problemas hemorrágicos, hipertensión arterial, insuficiencia renal o hepática.
- Sujetos que presenten resultados positivos a la prueba de embarazo o al estudio cualitativo de fármacos de abuso en orina.

3.3.5 Horario de toma de muestras y conservación

- Se recolectaron muestras de 8 –10 mL de sangre en tubos heparinizados.
- Las muestras sanguíneas se tomaron a los siguientes tiempos: 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas después de la administración del medicamento.
- Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 min. El plasma se transfirió a tubos de vidrio, limpios y etiquetados. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su análisis.



IV. RESULTADOS Y DISCUSION DE
RESULTADOS

4.1 Validación del método analítico para la cuantificación de ketoconazol en plasma

4.1 Linealidad

4.1.1 Linealidad del Sistema

La Figura 4.1 muestra la linealidad del sistema al graficar el cociente de la respuesta expresada en alturas de ketoconazol y del estándar interno (E.I) contra la concentración de ketoconazol en el rango de 0.3 – 10 ug/mL. Los resultados promedios se muestran en la tabla No.1.

La ecuación de la regresión lineal de la curva fue:

$$Y = 0.6287 x + 0.0625$$

Con un coeficiente de correlación de 0.9997.

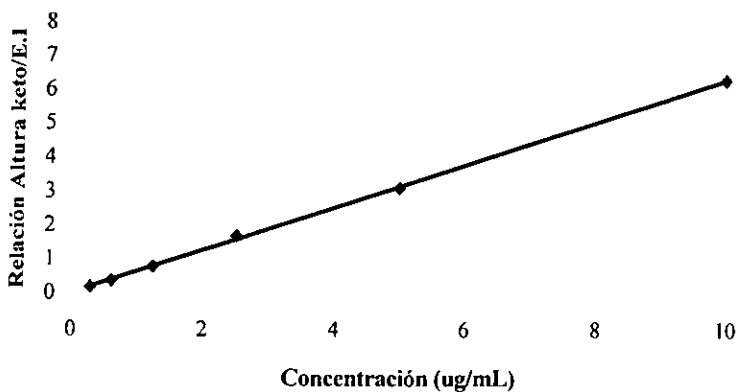


FIGURA 4.1
LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA LA CUANTIFICACION DE
KETOCONAZOL EN PLASMA

TABLA No.1
LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA LA CUANTIFICACION DE KETOCONAZOL

Concentración (ug/mL)	Relac \bar{X} Altura Keto/E.I	D.E	C.V %
0.3	0.23735	0.01962	2.44
0.625	0.42220	0.01934	1.44
1.25	0.83052	0.02285	2.75
2.5	1.74308	0.05227	2.99
5	3.16333	0.20387	2.97
10	6.34896	0.37097	3.85
$m = 0.6287$ $b = 0.0625$ $r = 0.9997$ $r^2 = 0.9994$			

4.1.2 Linealidad del método

La Figura 4.2 muestra la linealidad del método analítico al graficar el cociente de la respuesta expresada en alturas de ketoconazol y del estándar interno (E.I) contra la concentración de ketoconazol en el rango de 0.3 – 10 ug/mL. Los resultados se observan en la Tabla No.2.

La ecuación de regresión lineal de la curva fue:

$$Y = 0.55674 x + 0.08500$$

Con un coeficiente de correlación de 0.99883. Por lo tanto la relación de alturas de keto/E.I vs la concentración de ketoconazol se consideró lineal en el intervalo de trabajo de 0.3-10 ug/mL.

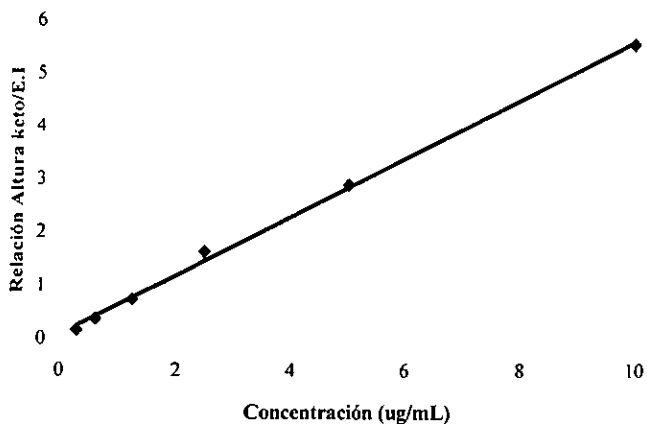


FIGURA 4.2
LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE KETOCONAZOL EN PLASMA

TABLA No.2
LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE KETOCONAZOL EN PLASMA

Concentración (ug/mL)	Relac Altura X Keto/E.I	D.E	C.V %
0.3	0.19289	0.02036	10.556
0.625	0.40706	0.04469	10.978
1.25	0.77493	0.01279	1.651
2.5	1.66733	0.07514	4.507
5	2.92679	0.10204	3.486
10	5.57991	0.24335	4.361
$m = 0.55674$ $b = 0.08500$ $r = 0.99884$ $r^2 = 0.99767$			

4.1.3 Especificidad

En la fig. 4.3 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras blanco de plasma, así como las añadidas con ketoconazol y estándar interno (butilparabeno), en la que se puede observar que los tiempos de retención para ketoconazol y estándar interno, fueron de 8.6 y 4.8 minutos respectivamente.

Asimismo, se encontró que los componentes endógenos del plasma y los fármacos aspirina y acetaminofen no interfieren en la determinación de ketoconazol o el estándar interno, ya que las señales de los mismos no sufren ningún cambio en el tiempo de retención ni en la altura del pico. De esta forma se consideró que el método analítico es específico para la cuantificación de ketoconazol en plasma.

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

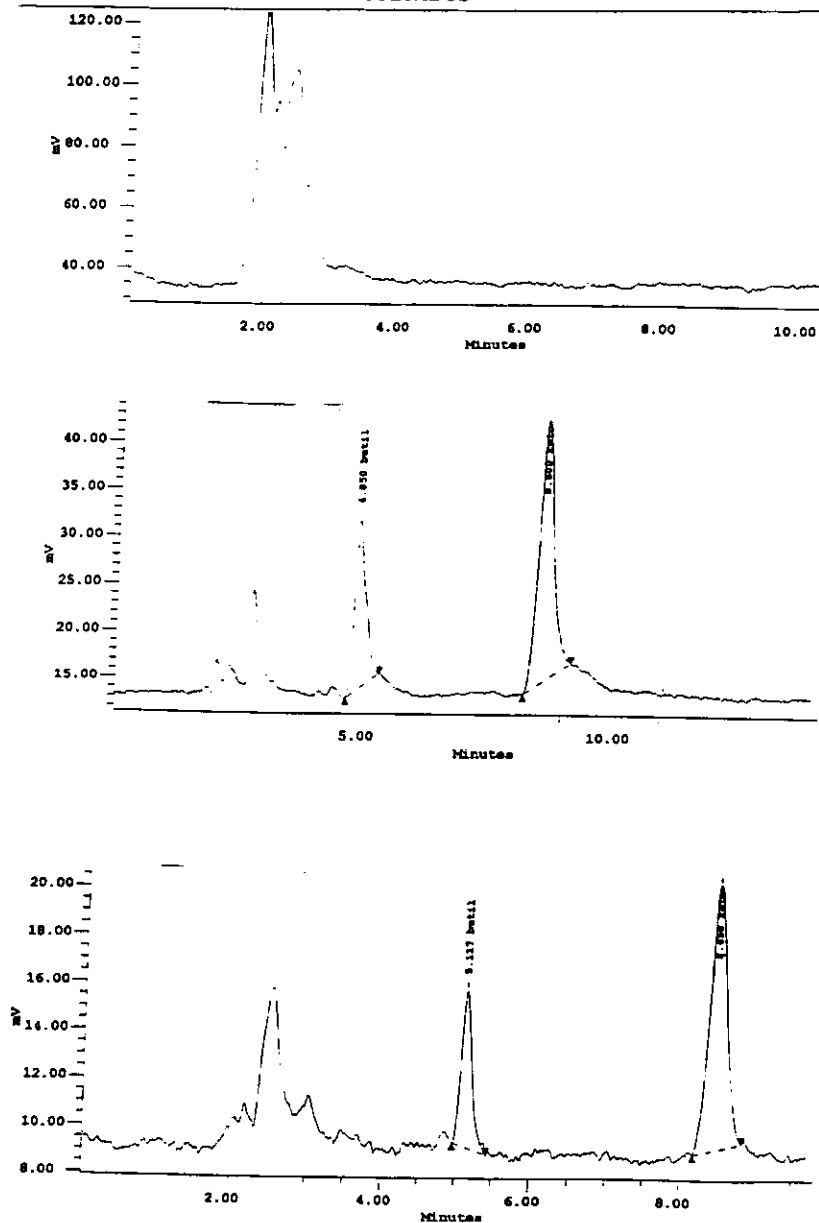


Fig. 4.3 Cromatogramas representativos para a) Blanco de plasma b) Plasma añadido de ketoconazol y estándar interno c) muestra de un voluntario sano después de la administración de 200 mg de ketoconazol.

4.1.4 Repetibilidad y reproducibilidad (precisión)

Las tablas No.3 y No.4 muestra los resultados de repetibilidad obtenidos para el intervalo de concentraciones de 0.3 – 10 ug/ml. analizada en dos días diferentes con tres réplicas para cada concentración, de acuerdo al especificado en la sección 3.2.3. El método analítico fue repetible y reproducible dado que ninguno de los coeficientes de variación fue mayor de 15%.

TABLA No.3
REPETIBILIDAD DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
KETOCONAZOL EN PLASMA

Conc ug/mL	Rel de Altura 1	Rel de Altura 2	Rel de Altura 3	Rel de Altura X	D.S	C.V %
0.3	1.0351	0.9864	0.9662	0.9959	0.0354	3.5565
0.625	1.2333	1.1560	1.1937	1.1943	0.0387	3.2364
1.25	1.5502	1.4173	1.5938	1.5204	0.0919	6.0468
2.5	2.1633	2.0310	2.1999	2.1314	0.0889	4.1688
5	3.2752	3.3509	3.4394	3.3552	0.0822	2.4494
10	5.2055	5.3796	5.5763	5.3871	0.1855	3.4437

TABLA No.4
REPRODUCIBILIDAD DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
KETOCONAZOL EN PLASMA

Conc ug/mL	Rel de Altura 1	Rel de Altura 2	Rel de Altura 3	Rel de Altura X	D.S	C.V %
DIA 1						
0.3	1.0351	0.9864	0.9662	0.9959	0.0354	3.5565
0.625	1.2333	1.1560	1.1937	1.1943	0.0387	3.2364
1.25	1.5502	1.4173	1.5938	1.5204	0.0919	6.0468
2.5	2.1633	2.0310	2.1999	2.1314	0.0889	4.1688
5	3.2752	3.3509	3.4394	3.3552	0.0822	2.4494
10	5.2055	5.3796	5.5763	5.3871	0.1855	3.4437
DIA 2						
0.3	0,2113	0,2129	0,2096	0,2113	0,0016	0,7792
0.625	0,4096	0,4504	0,3611	0,4071	0,0447	10,9788
1.25	0,7763	0,7615	0,7870	0,7749	0,0128	1,6509
2.5	1,6804	1,7351	1,5865	1,6673	0,0751	4,5067
5	2,8093	2,9782	2,9929	2,9268	0,1020	3,4865
10	5,5495	5,8370	5,5332	5,6399	0,1709	3,0304
Global						3.9457

4.1.5 Por ciento de recobro

En la tabla No.5 se observa que el recobro promedio fue de 93.61%.

TABLA No.5
POR CIENTO DE RECOBRO DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
KETOCONAZOL EN PLASMA

Concentración (ug/mL)	Relac Altura X en MeOH	Relac Altura X en plasma	% RECOBRO	C.V%
0.3	0.220384	0.211279	95.86	2.49
0.625	0.422203	0.407063	96.41	10.88
1.25	0.830524	0.774933	93.31	4.17
2.5	1.743308	1.66733	95.65	4.40
5	3.163329	2.926791	92.52	9.48
10	6.348962	5.579914	87.88	7.10
% de extracción promedio = 93.61%				

4.1.6 Por ciento de exactitud

La tabla 6 muestra el por ciento de exactitud de ketoconazol en el cual se observa que el método es exacto en el intervalo de trabajo de 0.625 a 10 ug/ml

TABLA No.6
PORCENTAJE DE DESVIACION PARA LA CUANTIFICACION DE
KETOCONAZOL EN PLASMA

Conc Nominal ug/mL	Conc Real ug/mL	% Desviación
0.3	0.1835	38.83
0.625	0.5397	13.65
1.25	1.2301	2.88
2.5	2.7056	8.22
5	5.1879	3.75
10	9.8671	1.32

4.1.7 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación fue de 0.3 ug/mL.

Con base en los resultados anteriores se puede establecer que el método analítico usado para la cuantificación de ketoconazol en plasma fue específico, lineal en un intervalo de concentraciones de 0.3 – 10 ug/mL, exacto y preciso por lo que se consideró adecuado para estudios de farmacocinética.

4.2 Estudio farmacocinético en voluntarios sanos

En la Tabla No.7 se muestran los valores de concentración promedio en plasma para cada tiempo de muestreo \pm la desviación estándar al administrar una dosis de 200 mg de ketoconazol.

En la figura 4.4 se presenta la gráfica promedio de los valores de concentración en plasma, encontrándose una gran variabilidad intersujeto.

En la figura 4.5 se presenta la gráfica logarítmica de los valores promedio de concentración en plasma de ketoconazol.

TABLA No.7
CONCENTRACION PLASMÁTICA PROMEDIO DEL KETOCONAZOL ug/mL
 \pm D.E EN VOLUNTARIOS SANOS

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Concentración (ug/mL) \pmD.S</i>
0	0
0.25	0.4161 \pm 0.091
0.5	0.5454 \pm 0.1890
1.0	1.6646 \pm 1.023
1.5	3.5455 \pm 2.033
4.0	3.3290 \pm 0.725
8.0	1.7549 \pm 0.625
12.0	0.6232 \pm 0.123
16.0	0.4644 \pm 0.080
20.0	0.4204 *
24.0	No detectable

* Solo se obtuvo un valor a las 20 horas.

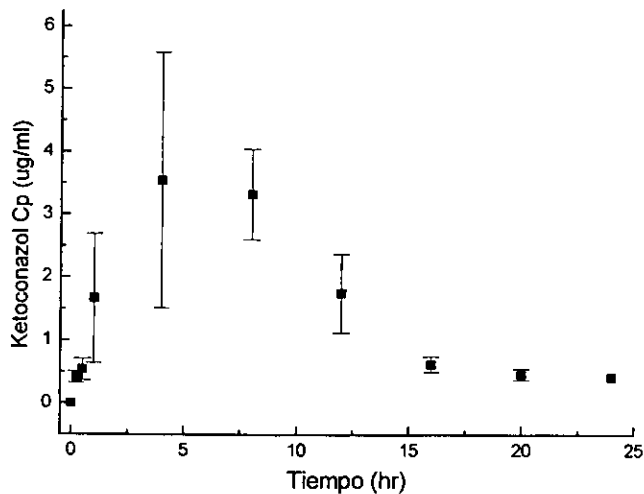


FIGURA 4.4

CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE KETOCONAZOL ug/mL \pm D.E

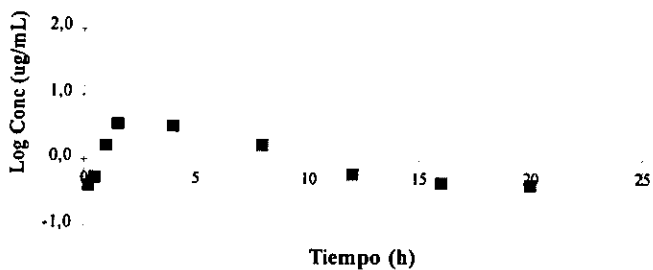


FIGURA 4.5

LOGARITMO DE LA CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE KETOCONAZOL ug/mL EN PLASMA

4.2.1 Análisis de parámetros farmacocinéticos

Existe poca información en la literatura acerca de la farmacocinética del ketoconazol.

Yih-Chain Huang et al reportan un $t_{1/2}$ de 1.7 h y un C_{max} de 4.22 ug/mL⁽⁵⁷⁾ para una dosis de 200 mg de ketoconazol mientras que Daneshmend, Tawfiq et al reporta un $t_{1/2}$ de 1.1 h y un C_{max} de 4.5 ug/mL⁽¹⁵⁾.

Los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos en el presente estudio se muestran en la tabla 8 en la que se puede observar que los parámetros requeridos para demostrar la bioequivalencia presentaron una gran variabilidad intersujeto.

La concentración plasmática máxima promedio fue de 3.9975 ug/mL, con un tiempo máximo promedio de 2.68h. Este C_{max} concuerda con lo reportado en la literatura de 3-4.5 ug/mL con un t_{max} de 1-2h⁽³¹⁾.

TABLA 8
PARAMETROS FARMACOCINETICOS INDIVIDUALES PARA CADA
VOLUNTARIO

SUJETO	ABC_0-t (ug/h/mL)	$ABC_0-\infty$ (ug/h/mL)	C_{max} (ug/mL)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)
1	39.228	40.795	7.4622	1.5	5.29
2	25.563	26.520	3.1463	1	4.46
3	30.860	31.622	4.4426	1.5	4.56
4	19.106	19.412	2.6438	4	3.91
5	18.516	18.516	2.4698	4	0.92
6	23.136	25.200	4.0094	1.5	6.91
7	31.838	32.439	4.5930	4	3.81
8	24.995	25.105	3.2157	4	2.55
X ± DE	23.693±6.9917	27.451±7.3313	3.9975±1.6061	2.68±1.4126	4.55±1.7836

El valor promedio de ABC 0-t fue de 23.963 ug/mL/h, mientras que la vida media osciló entre 0.92 – 6.91h. El $t_{1/2}$ reportado en la literatura va de 1.5-3h. En el presente trabajo se

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

observa que en los sujetos 1, 2, 3, 4 y 6 el $t_{1/2}$ fue mayor que lo esperado, ello podría deberse a:

- Los tiempos de muestreo no fueron los adecuados.
- La población mexicana podría tener diferencias en la eliminación del fármaco con respecto a las poblaciones estudiadas.

Los resultados anteriores nos muestran la necesidad de diseñar nuevos estudios para determinar los parámetros farmacocinéticos con mayor exactitud.

En la tabla 9 se muestran los valores individuales de ketoconazol a los diferentes tiempos de muestreo, en la que se puede observar que a las 24h no se detectó el ketoconazol en ninguno de los voluntarios.

TABLA No.9
CONCENTRACION PLASMÁTICA DE KETOCONAZOL EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO, PARA CADA VOLUNTARIO

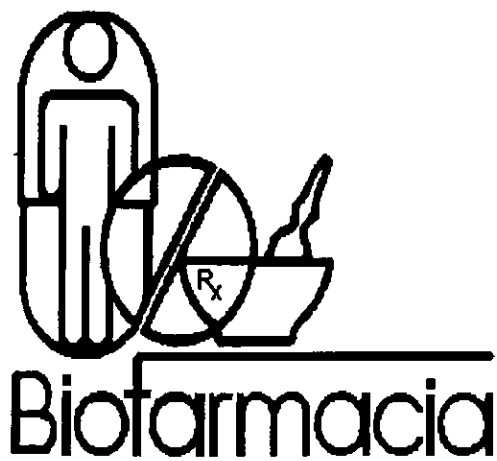
Vol	0	0.25	0.5	1	1.5	4	8	12	16	20	24
1	0	N.D	0.5	0.5664	7.4622	3.8301	2.1766	0.7093	0.5197	0.4204	N.D
2	0	0.4807	0.8788	3.1463	3.1382	2.9527	1.7925	-----	0.5166	N.D	N.D
3	0	N.D	0.4874	2.409	4.4426	3.9361	1.5131	0.5424	0.4487	N.D	N.D
4	0	0.3513	0.4052	2.3826	2.3731	2.6438	0.9255	0.4553	N.D	N.D	N.D
5	0	N.D	0.4791	1.6505	1.8682	2.4698	1.5914	N.D	N.D	N.D	N.D
6	0	N.D	N.D	1.0035	4.0094	2.9937	1.0319	0.6907	N.D	N.D	N.D
7	0	N.D	0.4766	0.4939	1.5245	4.5903	2.2443	0.7819	0.5233	N.D	N.D
8	0	N.D	N.D	N.D	N.D	3.2157	2.7636	0.5594	0.3125	N.D	N.D

Llama la atención que se hayan propuesto tiempos tan largos mientras que la fase de absorción no esta bien definida por falta de tiempo de muestreo en esa porción.

En el voluntario 8 solamente se puede cuantificar el ketoconazol a las 4, 8, 12 y 16 h lo cual viene a corroborar que sería necesario haber incluido más tiempos de muestreo entre 1.5 y 4 h.

En base a los resultados obtenidos la propuesta para realizar estudios de bioequivalencia de ketoconazol en México serían los siguientes:

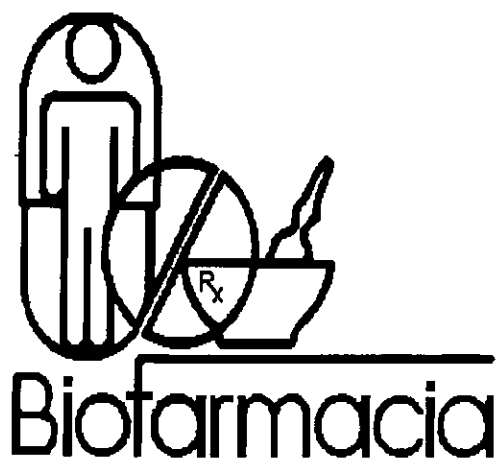
- ✓ Utilizar un diseño cruzado completo.
- ✓ Dada la gran variabilidad interindividual se sugiere que participen 24 voluntarios clínicamente sanos (examen físico completo, electrocardiograma, examen de orina en general, HIV, VDRL, biometría hemática).
- ✓ Edad 20-40 años
- ✓ Peso $\pm 10\%$ del peso ideal.
- ✓ No tomar bebidas alcohólicas 48 horas antes del estudio.
- ✓ No fumadores.
- ✓ No tomar ningún medicamento 2 semanas antes del estudio y durante el mismo.
- ✓ Sujetos que no hubiesen sido hospitalizados 8 semanas antes del estudio.
- ✓ Los voluntarios permanecerán en ayunas desde las 10 p.m del día anterior. A las 8:00 a.m se tomarán una dosis única de 200 mg de ketoconazol con 240 mL de agua.
- ✓ Tomar 10 ml de sangre a los siguientes tiempos: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 8 y 12 h después de la administración del medicamento en tubos heparinizados.
- ✓ Administrar un desayuno estándar a las 12 p.m, una comida a las 16:00 h y una cena a las 19:00 h.
- ✓ Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos y almacenar el plasma a -20°C ⁽⁵⁵⁾ hasta su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución.
- ✓ Periodo de lavado de 7 días.



V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar ketoconazol en plasma, utilizando un detector de fluorescencia.
- El método fue específico, lineal en el intervalo de concentración de 0.3-10 ug/mL, exacto y preciso, por lo que se considera adecuado para llevar a cabo estudios tanto de farmacocinética como de bioequivalencia.
- Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en los 8 voluntarios clínicamente sanos mostraron una gran variabilidad interindividual, con una C_{max} que oscila entre 2.4698-7.4622 ug/mL y vida media entre 0.92 y 6.91 h. Se recomienda aumentar el número de voluntarios como lo recomienda la norma A.24 por su gran variabilidad interindividual.
- Los tiempos de muestreo propuestos por el Hospital Español no serían los adecuados para llevar a cabo este tipo de estudios.
- Se sugiere que para el estudio de bioequivalencia de ketoconazol se modifique el protocolo y se utilicen los siguientes tiempos de muestreo: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 8.0 y 12 horas.



VI. APENDICE

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

APENDICE



HOJA DE CONSENTIMIENTO

Nombre del estudio: _____

Nombre del voluntario: _____

Edad: _____ Sexo: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____ CP: _____

Por medio de la presente, doy mi consentimiento pleno para participar, sin coacción alguna, en el estudio de bioequivalencia de productos comerciales conteniendo ketoconazol.

Asimismo manifiesto que estoy enterado de las características del estudio así como de las consecuencias del mismo y que he entendido claramente los objetivos del mismo y la forma en que participaré en él. También se me han explicado los cuidados que debo tener y los posibles efectos secundarios.

Atentamente

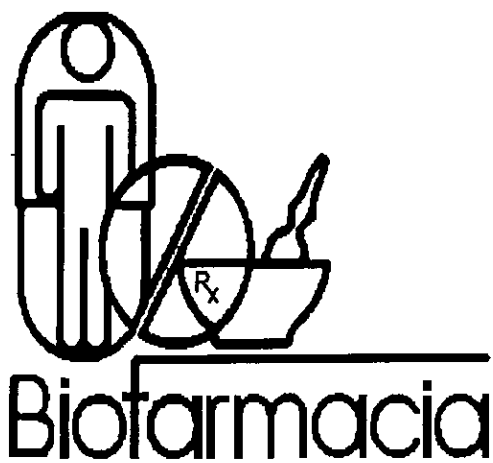
Nombre y firma

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

Responsable médico

Fecha



VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Guías y recomendaciones para realizar estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia en humanos.
2. Rodríguez Vindas, Julio. *Micología Médica*. I edición. Editorial de la Universidad Costa Rica. San José, Costa Rica. 1998. pp 19-42.
3. Hernández Veloz, María. *Valoración de la actividad "in vitro" del keto (R41400) frente a diferentes cepas de cándida aisladas de casos patológicos*. UNAM - Facultad de Química. México. 1991. pp 19-34.
4. Torres – Rodríguez, J.M y Martínez Quesada, J. *Micosis que afectan piel y mucosas*. I Edición. Ediciones Doyma. Madrid España. 1987. pp 1-11.
5. Arenas, Roberto. *Dermatología*. I edición. Libros Mac. Graw Hill. México – México. 1989. pp 1-5
6. Domankos, Anthony; Odom, Richard. *Tratado de Dermatología*. III Edición. Editorial Salvat. Barcelona, España. 1987. pp 376-473.
7. Benkow, Robert; Fletcher, Andrew, et al. *Manual Merck*. VIII Edición. P 54. Ediciones Doyma. Barcelona – España. 1990. pp 150.
8. Arenas, Roberto. *Micología Médica*. Editorial Interamericana. 1º Edición. 1993. México-México. Cap 34. 359-372.
9. *Farmacopea mexicana*. VI Edición. Pág 608-609.
10. Merk Index. p 904.
11. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. PLM 42 Edición. 1996.
12. USP 23/NF 18(1995). pp 864-865.

BIBLIOGRAFIA

13. Francis Comby; Jean Francois Lagorde; Jacques Buxeraud and Claude Raby. *Antithyroid action of ketoconazole: in vitro studies and rat in-vivo studies*. J. Pharm. Pharmacol. 46: 50-53. (1994).
14. Dismukes, William E. *Azole antifungal drugs. Old and new*. Ann. Intern. Med. 109(3). 177-179. (1988).
15. Daneshmend, Tawfique K and Warnock, David W. *Clinical Pharmacokinetics of ketoconazole*. Clin. Pharmacokinet. 14.13 – 34 (1988).
16. Goodman L. Gilman A. *Bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Médica Panamericana*. VII Edición. 1991. pp 1167.
17. Martindale. *The Extrapharmacopeia*. Reynolds JEF. XXX Edición. The Pharmaceutical Press. London – England. 1993. pp 326-328.
18. Brass C, Galgiani; Blaschke T; Defelice R, O Reilly. *Disposition of ketoconazol oral antifungal in human*. Antimicrob. Agents. Chemother. 24:151-158. (1982).
19. L. K. Pershing; J. Corlett and C. Jorgensen. *In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum*. Antimicrob. Agent. Chemother. 38(1):90-95. (1994).
20. Craven, Philip C; Graybill, John; Jorgense, James Ch; Dismukes, William E and Levine, Bernard E. *High – dose ketoconazole for treatment of fungal infections of the central nervous system*. Ann. Inter. Med. 98. 160-167. (1983).
21. *Guía Profesional de Medicamentos*. II Edición. Editorial El Manual Moderno S.A de C.U México. 1987 p 54-57.
22. Cedri M, Smith. *Farmacología*. II Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina. 1993. P 847.
23. Craig, Charles R and Stitzel, Robert E. *Modern Pharmacology*. III Edición. Library of Congress. E.E.U.U. 1990. P 757-766.
24. Maksymuk A M; Levine, H B and Bodey, G.P. *Pharmacokinetics of ketoconazole in patients with neoplastic disease*. Antimicrob. Agents. Chermother. 22: 43-46. (1982).

BIBLIOGRAFIA

25. James G. Baxter; Corstiann Brass; Jerome J. Shentag and Richard L. Slaughter. *Pharmacokinetics of ketoconazole administered intravenously to dogs and orally as tablet and solution*. J. Pharm. Sci. 75(5):443-446. (1986).
26. Borelli D, Bran; Fuentes, J; Legendre, R; Leiderman, R et al. *Ketoconazol an oral antifungal: laboratory and clinical assessment of imidazol drugs* Post. Med. J. 55: 657-661. (1979).
27. *Información de Medicamentos*. Tomo II. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid – España. 1989. p 1408-1410.
28. Drugs. 47 Edition. *Facts and comparisons*. E.E.U.U. 1993 p 1886-1888.
29. Falabella F, Rafael; Escobar R, Carlos. *Fundamentos de Medicina*. Cuarta edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 1990.
30. S. Lazarus, Gerald; V. Jegasothy, Brian; E. Bondi, Edwards. *Dermatología*. I Edición. Editorial Americana. Buenos Aires – Argentina. 1993. P 367-373.
31. *Formulario Terapéutico Nacional 93*. República de Venezuela. Ministerio de Sanidad y existencia social. OPS.OMS. I Edición. 1993. LITOBTRIT. pp 253-254.
32. Katzung, Bertram G and Trevor, Anthony J. *Pharmacology*. IV Edición. Editorial Appleton&Lange. E.E.U.U 1995. pp 327-330.
33. A. Harvey, Richard; C. Champe, Pamela. *Pharmacology*. I Edición. Editorial Lippincott Company. E.E.U.U. 1992 p 307-311.
34. Sugar, Alan M; Alsip, Steven G; Galgiani, John; Graybill, John R; Dismukes, William E and Steven, David A. *Pharmacology and Toxicity of high – dose ketoconazole*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 31 (12). 1874-1878. 1987.
35. Denise Y. Gomez; Vincent J. Wachter; Stephen J. Tomlanovich; Mary F. Hebert and Leslie Z. Benet. *The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine*. Clin. Pharmacol. Ther. 58(1):15-19. (1995).
36. M. Roy First; Patricia Weiskittel; J. Wesley Alexander; Timothy J. Schroeder; Steven A. Myre and Amadee J. Pesce. *Concomitant administration of cyclosporin and ketoconazole in renal transplant recipients*. Lancet. 182:1198-1201. (1889).

37. Ghada, Omar; Whitin, Paul; Hawksworth, Gabrielle; Humphrey, Michael Jand; Burke, Danny. *Ketoconazole and fluconazole inhibition of the metabolism of cyclosporin a by human liver in vitro*. Ther. Drug. Monit. 19:436-445 (1997).
38. Blum, Robert; D Andrea, David T; Florentino, Becky; Wilton, John; Hilligoss, Donald; Gardner, Mark J; Golsteind, Harvey and Schentag, Jerome. *Increased gastric pH and the bioavailability of fluconazol and ketoconazole*. Ann. Med. Int. 114(9). 755-757. (1991).
39. Gennaro, Alfonso R. *Remington's Pharmaceutical Sciences*. XVIII Edición. Editorial Merk Publishing Company. Pennsylvania – E.E.U.U. 1990. P 1234-1235.
40. Lisa L. Von Molke; David J. Greenblatt; Jerold S. Harmatz; Su Xiang Duan; Lisa M. Harrel; Monette M. Cotreau-Bibbo; Gary A. Pritchard; C. Eugene Wright and Richard I. Shader. *Triazolam biotransformation by human liver microsomes in vitro: effects of metabolic inhibitors and clinical confirmation of a predicted interaction with ketoconazole*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 276(2):370-378. (1996).
41. Anu Varhe, MB.; Klaus T. Olkkola, MD. And Pertti J. Neuvonen, MD. *Oral triazolam is potentially hazardous to patients receiving systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole*. Clin. Pharmacol. Ther. 56(6):601-607. (1994).
42. David J. Greeblatt; lisa L. Van Molke; Jerold S. Harmatz; Lisa M. Harrol; Sara Tobias; Richard I Shader and C. Eugene Wright. *Interaction of triazolam and ketoconazole*. Lancet. 345(8943):191. (1995).
43. Greenblatt, David; Wright Eugene, C; Von Moltle, Lisa; Harmatz, Jerold; Ehrenbert, Bruce; Harrel, Lisa, Corbett, Kate and Shader, Richard. *Ketoconazole inhibition of triazolam and alprazolam clearance: Differential kinetic and dynamic consequences*. Clin. Phamacol. Ther. 64(3). 237-247. (1998).
44. Stephen C. Piscitelli; Thomas F. Goss; John H. Wilton; David T. D'Andrea; Harvey Goldstein and Jerome J. Schentag. *Effects of ranitidine and sucralfate on ketoconazole bioavailability*. Antimicrob. Agents. Chemother. 35(9):1765-1771. (1991).
45. James D. Hoeschelez; Anindya K. Roy; Vincent L. Pecoraro and Peggy L. Corver. *In vitro analysis of the interaction between sucralfate and ketoconazole*. Antimicrob. Agents. Chemother. 38(2):319-325. (1994).

46. Peggy L. Carver; Rosemary R. Berardi; Margaret J. Knapp; Joan M. Rider; Carol A. Kauffman; Suzanne F. Bradley and Maha Atassi. *In vivo interaction of ketoconazole and sucralfate in healthy volunteers*. Antimicrob. Agents. Chemother. 38(2):326-329. (1994).
47. Brown, Michael; Maldonado, Alma; Meredith, Christopher and Speeg, K. V. *Effect of ketoconazole on hepatic oxidative drug metabolism*. Clin. Pharmacol. Ther. 37(3). 290-297 (1985).
48. Yamashita, Sharon K; Ludwig, Elizabeth A; Jusko, William J and Middleton, Junior. *Lack of pharmacokinetics and pharmacodynamic interactions between ketoconazole and prednisolone*. Clin. Pharmacol. ther. 1991. 49(5). 558-70.
49. Zurcher, Regula; Frey, B.M and Frey, F.J. *Impact of ketoconazole on the metabolism of prednisolone*. Clin. Pharmacol. Ther. 45(4). 366-72. (1989).
50. Haughey, David and Jusco, William. *Effect of ketoconazole on methylprednisolone Pharmacokinetics and receptor/gene-mediated pharmacodynamics*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 259(2). 826-832. (1991).
51. B.Ulrich; R.F. Speck and B.M. Frey. *Pharmacokinetics/pharmacodynamics of ketoconazole-prednisolone interaction*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 260(2). 487-490. (1992).
52. Greenblatt, David; Von Moltle, Lisa; Harmatz, Jerold; Mertzanis, Polyxane; Graf, Jennifer; Durol, Liza; Counihan, Molly; Schechter, Barbara and Shader, Richard. *Kinetic and dynamic interaction study of zolpidem with ketoconazole, itraconazole and fluconazole*. Clin. Pharmacol. Ther. 64: 661-71. (1998).
53. Spina, Edoardo; Arena, Domenico; Scardo, Marie Gabriella; Fazio, Antonio; Pisani, Francesco and Perucca, Emilio. *Elevation of plasma carbamazepine concentrations by ketoconazole in patients with epilepsy*. Ther. Drug. Monit. 19:535-538 (1997).
54. Anil P. O'Mello; Martin J. D'Souza. *Pharmacokinetics of ketoconazole-antipyrine interaction*. Lancet. 11:209-210. (1985).
55. V. L. Pascussi; J. Bennett; P. K. Narang and D. C. Chatterji. *Quantitation of ketoconazole in biological fluids using high-performance liquid chromatography*. J. Pharm. Sci. 72(12):1467-1469. (1983).

56. K.B. Alton. *Determination of the antifungal agent, ketoconazole, in human plasma by high-performance liquid chromatography.* J. Chromatogr. 221:337-344. (1980).
57. Sarah F. Swezey; Katheen M. Giacomini; Anthony Abang; Corstiaan Brass; David A. Stevens and Terrence F. Blaschke. *Measurement of ketoconazole a new antifungal agent, by high-performance liquid chromatography.* J. Chromatogr. 227:510-515. (1982).
58. N.R. Badcock. *Micro-determination of ketoconazole in plasma or serum by high-performance liquid chromatography.* J. Chromatogr. 396:436-440. (1984).
59. Christopher M. Riley and Margaret O. James. *Determination of ketoconazole in the plasma, liver, lung and adrenal of the rat by high-performance liquid chromatography.* J. Chromatogr. 377:287-294. (1986).
60. Huan, Yih - Chaiun, Colaizzi, John L; Bierman, Robert H; and Heykants, J. *Pharmacokinetics and dose proportionality of ketoconazole in normal volunteers.* Antimicrob. Agents. Chemother. 30(2) 206-210. (1986).
61. Hellriegel, Edward T; Bjornsson, Thorir D and Hauck, Walter. *Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: implications for bioavailability and bioequivalence studies.* Clin. Pharmacol. Ther. 60(6). 601-607. (1996).
62. S. Braggio, R.J Barnaby; P Grossi; M Cugola. *A strategy for validation of bioanalytical methods.* J Pharm. Biomed. Anal. 14. 375-368. (1996).