



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE  
AZITROMICINA EN POBLACIÓN MEXICANA.”**

**TESIS MANCOMUNADA**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
P R E S E N T A N:  
**FABIOLA ISABEL ANGELES GONZALEZ**  
**ERIK PEREZ RAMIREZ**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA



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**

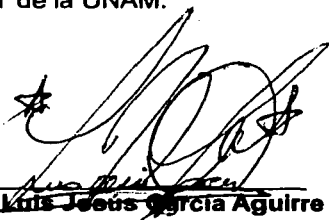
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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            Dra. Helgi Helen Jung Cook  
Vocal                M en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado  
Secretario          M en F. Luis Jesús García Aguirre  
1er. Suplente       M en C. José Manuel Morales Hernández  
2º. Suplente        M en F. Liz Jannet Medina Reyes

Sitio donde se desarrolló el tema:  
Laboratorio de farmacocinética del Edificio de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM.



M. en F. Luis Jesús García Aguirre

Asesor de Tema



M. en F. Liz Jannet Medina Reyes

Supervisor Técnico



Fabiola Isabel Angeles González

Sustentante



Erik Pérez Ramírez

Sustentante

**T**odo pasa y todo queda,  
pero lo nuestro es pasar,  
pasar haciendo caminos,  
caminos sobre el mar.

Nunca perseguí la gloria,  
ni dejar en la memoria  
de los hombres mi canción;  
yo amo los mundos sutiles,  
ingrávidos y gentiles,  
como pompas de jabón.

Me gusta verlos pintarse  
de sol y grana, volar  
bajo el cielo azul, temblar  
súbitamente y quebrarse...

Nunca perseguí la gloria.

Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.

Al andar se hace camino  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.

Caminante no hay camino  
sino estelas en la mar...

**H**ace algún tiempo en ese lugar  
donde hoy los bosques se visten de espinos  
se oyó la voz de un poeta gritar  
"Caminante no hay camino,  
se hace camino al andar..."

Golpe a golpe, verso a verso...

Murió el poeta lejos del hogar.  
Le cubre el polvo de un país vecino.  
Al alejarse le vieron llorar.  
"Caminante no hay camino,  
se hace camino al andar..."

Golpe a golpe, verso a verso...

Cuando el jilguero no puede cantar.  
Cuando el poeta es un peregrino,  
cuando de nada nos sirve rezar.  
"Caminante no hay camino,  
se hace camino al andar..."

Golpe a golpe, verso a verso.

## **Dedico esta obra**

### **A mis padres:**

*Yolanda y Sergio por su constante e incasable apoyo, por educarme a dar mi mejor esfuerzo, por alentar mi desarrollo de una manera íntegra y por su cariño que me permite disfrutar de las cosas sencillas de la vida.*

### **A mis hermanos:**

*Daniel, Adrián y Lety por mantenernos siempre juntos en las buenas y en las malas, por enriquecerme con sus distintas formas de pensar... A Daniel por su audacia, a Adrián por su nobleza y compromiso y a Lety por su sensatez.*

*Sin ustedes muchas alegrías de mi vida no serían posibles.*

### **A mi gente:**

*A mis abuelos agradeciendo a la hermosa familia que me dejan en herencia. (†) A mis tíos por tener confianza en mí e interesarse en lo que hago. A mis primos sobretodo a los "freseros" por contagiarme su ánimo, su alegría y ser fuente inagotable de mucho relajo.*

### **A César:**

*Porque el amor que día con día me brinda se convierte de manera paciente en entendimiento, confianza, apoyo y motivación. Gracias por ofrecerme tu cariño, por estar conmigo y por valorarme tanto.*

### **A Andrea:**

*Que además de ser una excelente persona y gran amiga, me ofreció su gran ayuda incondicional y se convirtió en mi equipo de trabajo y brazo derecho durante mi recorrido por la Facultad de Química.*

**Agradezco :**

*A Erik por participar conmigo de esta experiencia que nos ha dejado muchas enseñanzas y que nos a hecho recorrer senderos diversos e inesperados.*

*A todo el equipo que conforma el laboratorio de farmacocinética en la Facultad de Medicina por alentar de distintas formas el desarrollo de este trabajo.*

*A Lety por su esfuerzo en la última fase del desarrollo de esta tesis.*

*A mis compañeros de primer semestre con quienes inicie el largo trecho de la Facultad de Química . A todos y cada uno de mis amigos de las "donas" con quienes disfrute algún momento ( de trabajo o esparcimiento) alrededor de este recinto de la Facultad. Realmente, sin olvidar a ninguno, sinceras gracias a todos ustedes.*

*A Angel, Eduardo, Mario y René por permitirme compartir mis ratos "chabelescos" con ustedes. Gracias.*

*A aquellas personas que conforman la familia salesiana que confían en mí y continúan hoy en día brindándome su apoyo.*

*A amigos, maestros y gente cercana a quienes he conocido a lo largo de mi vida y que dejaron huella en mi formación tanto personal como académica.*

***" Hodie labor cras fructus"***

## **Agradezco a:**

*Dios*, por permitirme día a día el gusto de vivir y descubrirlo como sonrisa en el atardecer, destello en la tormenta, sonido en el cual flotan las estrellas y consejo en la gente buena que ha llegado conmigo a compartir el milagro de ser.

*Tommy y Chava*, por su amor incondicional e incansable esfuerzo, por que nunca han dejado de creer en mí y brindarme su confianza, a ellos me debo, por que mas que mis padres han sido los perpetuos amigos con quienes he compartido sueños, temores, desvelos, enojos y mi vida. Nunca seré lo suficientemente mayor ni estudiado, como para ser mas sabio que ustedes...gracias por estar aquí.

*Chatran y Chatrancito*, mis patños de inconsolables risas que han sabido brindarme su apoyo a través de la alegría que emanan sus nobles y cálidos corazones; solo Dios y yo sabemos cuanta felicidad han transmitido mis hermanos a mi vida, al compartir sus pasos con los míos.

*Alexandro (Taq)*, por la bien lograda amistad que hemos forjado a base de parrandas extenuantes y exquisitos festines filosóficos, que mas de una vez nos han conducido a desvelos de inimaginable reflexión, donde solo el buen gusto de su música podría ambientar la partida de la angustia. Gracias por dejarme conocer a ese brillante genio de tatuada sonrisa e insufrible meditación.

*Fabiola (Fa)*, por permitirme conocer a una mujer de nobleza sin igual, que sabe entregarse por un sueño sin pedir nada a cambio; la belleza de tu ser solo puede opacarse por la sinceridad con la que amas y la sabiduría indómita con la cual te conduces. Solo podría haber realizado una tesis mancomunada con alguien de cuyas palabras se enriqueciera mi vida...y esa eres tú.

*Luis y Liz*, por darme la última enseñanza como profesionista y persona; así como la paciencia y empeño que compartieron con Fa y conmigo para que llegara éste día.

**Agradezco a:**

*Mi* Abuelita *Marí*, por su cariño e incondicional apoyo. También agradezco a cada uno de mis tíos, ya que han sabido apoyar mis decisiones y alentar mis locuras, en especial agradezco con todo mi ser a mi tía *Mariana*, dama de increíble presencia y sutil comprensión que junto a mis padres, se cuenta como una de las primeras personas en apoyarme incondicionalmente.

*Italia*, ese pequeño escuincle de rojo ser. De ti he aprendido el valor de la libertad y la sensatez. Solo una mujer como tú posee tanta personalidad y decisión. Si algo aprendo de nuestra convivencia es la fortaleza que logras transmitir con tu tenaz carácter.

*Oscar*, ese coyote indulgente reflejo de mi conciencia. El amigo sabio a través del tiempo, ya que con tu poética vida has logrado llegar en el momento oportuno para brindar auxilio a mi desesperación con tu aclamada sonrisa.

*Miriam* y *Diego*, por su incansable buen humor y las exquisitas sobremesas que no se hallan sino plagadas de alegría y reflexión. En particular agradezco a *Miriam* por hacerme segunda en un sin fin de parrandas, solo nosotros sabemos cuanto consuelo y alivio nos brinda degustar un buen baile de salón.

*Holber* y *Ricardo*, por que sin su presencia en ésta última etapa, ni la tesis ni otras tantas cosas serían el día de hoy una realidad (¡Arriba Calí y las traídas!)

*Leti*, Gracias por prestar auxilio a nuestro proyecto en su última etapa, sin ti el esfuerzo no hubieres llegado a su conclusión.

Todos mis compañeros y Maestros que día a día creen en mi proyecto de vida y animan mis esfuerzo a través de su cariño y respeto. Gracias en particular a todos mis amigos de primer semestre que aún el día de hoy poseen el mismo brillo y presencia en mi vida que cuando la H.H.F.E.F.A. Gracias a Marco Cobyn por sus amplios y bien explicados consejos.



**K**arma Police, arrest this man, he talks in maths

He buzzes like a fridge, he's like a detuned radio  
Karma Police, arrest this girl, her hitler hairdo, is making me feel ill  
And we have crashed her party  
This is what you get, this is what you get  
This is what you get, when you mess with us

**K**arma Police, I've given all I can, it's not enough

I've given all I can, but we're still on the payroll  
This is what you get, this is what you get  
This is what you get, when you mess with us  
And for a minute there, I lost myself, I lost myself  
And for a minute there, I lost myself, I lost myself

For a minute there, I lost myself, I lost myself

*Karma Police  
Radiohead  
OK Computer*

## RESUMEN

### “Estudio de Biodisponibilidad de Azitromicina en Población Mexicana”

En el presente trabajo se estudió el efecto del género en la farmacocinética de la “Azitromicina” en población mexicana. El estudio se llevó a cabo en 24 voluntarios sanos. Se tomaron muestras sanguíneas a las 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, 48 y 72 horas, después de recibir una dosis oral única de 500mg.

Para cuantificar las muestras plasmáticas se empleó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), utilizando una columna X-Terra C18 (250 x 4.6 mm) 5  $\mu\text{m}$  a 35  $^{\circ}\text{C}$ , una mezcla de fase móvil 40:60 v/v acetonitrilo y solución amortiguadora de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.05 M y pH = 7.2) y un detector electroquímico.

Los resultados fueron los siguientes: Hombres:  $\text{ABC}_{(0 \rightarrow \infty)}$   $5.9555 \pm 1.8052$  ( $\text{mg} \cdot \text{h/L}$ ),  $\text{C}_{\text{máx}}$   $0.6395 \pm 0.1872$  ( $\text{mcg/mL}$ ),  $\text{T}_{\text{max}}$   $2.4167 \pm 0.9003$  (h),  $t_{1/2}$   $22.8776 \pm 6.6512$  (h) y  $\text{CL/F}$   $90.8895 \pm 26.4003$  ( $\text{L/h}$ ). Mujeres:  $\text{ABC}_{(0 \rightarrow \infty)}$   $7.6526 \pm 3.8831$  ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $\text{C}_{\text{máx}}$   $0.8166 \pm 0.5150$  ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $\text{T}_{\text{máx}}$   $2.7273 \pm 0.7862$  (h),  $t_{1/2}$   $20.7777 \pm 6.8604$  (h) y  $\text{CL/F}$   $91.0925 \pm 65.7691$  ( $\text{L/h}$ ). Posteriormente se realizó la comparación de los resultados anteriores, los resultados obtenidos mostraron la ausencia de diferencias estadísticamente significativas.



## INDICE

	Pág
<b>RESUMEN</b>	
<b>1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>2 GENERALIDADES</b>	<b>4</b>
2.1 <b>Estructura</b>	<b>7</b>
2.2 <b>Propiedades Físicoquímicas</b>	<b>8</b>
2.3 <b>Farmacocinética</b>	<b>9</b>
2.3.1 <b>Absorción</b>	<b>9</b>
2.3.2 <b>Distribución</b>	<b>9</b>
2.3.3 <b>Metabolismo</b>	<b>10</b>
2.3.4 <b>Eliminación</b>	<b>10</b>
2.4 <b>Farmacodinamia</b>	<b>10</b>
2.5 <b>Indicaciones Terapéuticas</b>	<b>11</b>
2.6 <b>Efectos Adversos</b>	<b>13</b>
2.7 <b>Interacciones con otros fármacos</b>	<b>14</b>
2.8 <b>Datos preclínicos de seguridad</b>	<b>15</b>
2.9 <b>Contraindicaciones</b>	<b>15</b>
2.10 <b>Precauciones</b>	<b>16</b>
2.10.1 <b>Generales</b>	<b>16</b>
2.10.2 <b>Durante el embarazo y la lactancia</b>	<b>17</b>
2.11 <b>Efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y fertilidad</b>	<b>17</b>
2.12 <b>Presentaciones farmacéuticas de azitromicina disponibles en México</b>	<b>17</b>
2.13 <b>Métodos de extracción reportados para azitromicina</b>	<b>18</b>
<b>3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	<b>21</b>



	Pág	
<b>3.1</b>	<b>Desarrollo de un método analítico para cuantificar azitromicina en muestras plasmáticas por medio de CLAR</b>	<b>22</b>
3.1.1	Material y equipo empleado para la cuantificación de azitromicina en muestras plasmáticas por medio de CLAR	22
3.1.2	Soluciones empleadas	23
3.1.3	Selección de las condiciones cromatográficas para la cuantificación de azitromicina a través de CLAR	26
3.1.4	Desarrollo de una técnica analítica para la extracción de azitromicina de muestras plasmáticas	30
<b>3.2</b>	<b>Validación del método analítico de cuantificación de azitromicina en muestras plasmáticas por medio de CLAR</b>	<b>32</b>
3.2.0	Adecuabilidad del sistema	32
3.2.1	Validación del sistema	32
3.2.1.1	<i>Linealidad</i>	32
3.2.1.2	<i>Precisión</i>	34
3.2.2	Validación del método	34
3.2.2.1	<i>Rango</i>	35
3.2.2.2	<i>Recuperación absoluta</i>	35
3.2.2.3	<i>Linealidad</i>	36
3.2.2.4	<i>Precisión</i>	37
3.2.2.4.1	Repetibilidad	37
3.2.2.4.2	Reproducibilidad	37
3.2.2.5	<i>Exactitud</i>	38
3.2.2.6	<i>Estabilidad</i>	38
3.2.2.7	<i>Límite de cuantificación</i>	39
3.2.2.8	<i>Límite de detección</i>	40
3.2.2.9	<i>Selectividad</i>	40
<b>3.3</b>	<b>Diseño del estudio clínico en voluntarios sanos</b>	<b>41</b>
3.3.1	Tipo de estudio	41



	Pág	
3.3.2	Elección de voluntarios para el estudio clínico	42
3.3.3	Procedimiento	44
3.4	<b>Procedimiento para el análisis de las muestras y criterios de control durante el análisis</b>	45
3.4.1	Criterios de Validez de la Corrida	45
3.4.2	Criterios de Selección de datos en caso de Repetición	46
3.5	<b>Cálculo de los parámetros farmacocinéticos de azitromicina en población mexicana</b>	48
3.6	<b>Análisis estadístico de los parámetros farmacocinético</b>	49
4	<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	50
4.1	<b>Resultados del desarrollo del método analítico para cuantificar azitromicina de muestras plasmáticas por medio de CLAR</b>	50
4.1.1	Condiciones cromatográficas del método analítico	50
4.2	<b>Resultados de la validación del método analítico para cuantificar azitromicina de muestras plasmáticas por medio de CLAR</b>	53
4.2.0	Adecuabilidad del Sistema	53
4.2.1	Resultados de la Validación del Sistema	54
4.2.1.1	<i>Linealidad</i>	54
4.2.1.2	<i>Precisión</i>	56
4.2.2	Resultados para la Validación de Método:	56
4.2.2.1	<i>Linealidad</i>	56
4.2.2.2	<i>Recuperación Absoluta</i>	58
4.2.2.3	<i>Precisión – Repetibilidad</i>	58
4.2.2.4	<i>Precisión - Reproducibilidad</i>	59
4.2.2.5	<i>Exactitud</i>	60
4.2.2.6	<i>Estabilidad</i>	61
4.2.2.7	<i>Límite de cuantificación</i>	64
4.2.2.8	<i>Límite de detección</i>	65
4.2.2.9	<i>Selectividad</i>	65



	Pág
4.3	67
<b>Análisis de las muestras obtenidas para el ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE AZITROMICINA EN POBLACIÓN MEXICANA</b>	
4.4	75
<b>Obtención de parámetros farmacocinéticos de Azitromicina, en voluntarios mexicanos</b>	
5	78
<b>CONCLUSIONES</b>	
<b>ANEXO I DATOS FARMACOCINETICOS</b>	79
<b>ANEXO II PERFILES FARMACOCINÉTICOS</b>	81
<b>ANEXO III TOXICIDAD DE REACTIVOS</b>	89
<b>ANEXO IV GLOSARIO</b>	92
<b>REFERENCIAS</b>	94

### INDICE DE TABLAS

	Pag.
1	12
<i>Microorganismos y enfermedades contra los que Azitromicina muestra actividad</i>	
2	14
<i>Interacciones de Azitromicina con otros fármacos</i>	
3	18
<i>Presentaciones farmacéuticas de azitromicina disponibles en México</i>	
4	33
<i>Preparación de muestras para la evaluación del sistema.</i>	
5	35
<i>Preparación de muestras para la evaluación del método (parte 1)</i>	
6	35
<i>Preparación de muestras para la evaluación del método (parte 2)</i>	
7	38
<i>Protocolo de muestreo para determinar estabilidad en muestras de voluntarios</i>	



	Pag.	
8	<i>Fármacos de prueba empleados en la demostración de selectividad del método</i>	41
9	<i>Descripción del medicamento</i>	42
10	<i>Condiciones Cromatográficas</i>	51
11	<i>Adecuabilidad del sistema</i>	54
12	<i>Linealidad del sistema</i>	55
13	<i>Precisión del sistema</i>	56
14	<i>Linealidad del método</i>	57
15	<i>Recobro Absoluto</i>	58
16	<i>Repetibilidad del método analítico</i>	59
17	<i>Reproducibilidad del método analítico</i>	59
18	<i>Exactitud del Método</i>	60
19	<i>Estabilidad de muestra procesada</i>	61
20	<i>Estabilidad a temperatura ambiente</i>	62
21	<i>Estabilidad del ciclo congelación – descongelación</i>	63
22	<i>Estabilidad de la muestra refrigerada</i>	63
23	<i>Resumen de las pruebas de estabilidad</i>	64
24	<i>Limite de cuantificación</i>	65
25	<i>Relación de peso, talla e IMC de los voluntarios</i>	67
26	<i>Curvas de muestras control</i>	68
27	<i>Ecuaciones de las curvas de muestras control</i>	69
28	<i>Muestras control analizadas a lo largo del estudio</i>	70
29	<i>Resumen de las muestras repetidas por incumplimiento en los criterios de validez</i>	71
30	<i>Concentraciones plasmáticas (Cp) de azitromicina por género y promedio</i>	71
31	<i>Parámetros farmacocinéticos de voluntarios mexicanos en estado de salud a los cuales se les administró una dosis única de 500mg de azitromicina vía oral. (ambos géneros y población total)</i>	75



	Pag.	
32	<i>Resultados del análisis estadístico para determinar diferencia en la Biodisponibilidad de Azitromicina para ambos géneros en población mexicana.</i>	76
33	<i>Constantes calculadas para el modelo bicompartimental de azitromicina a partir de una administración oral única de 500mg en voluntarios mexicanos sanos.</i>	77

### INDICE DE FIGURAS

1	<i>Estructura química de Eritromicina y Azitromicina</i>	7
2	<i>Mecanismo de Acción de Azitromicina</i>	11
3	<i>Estructura de Azitromicina, Claritromicina y Roxitromicina</i>	29
4	<i>Etapas de la técnica analítica para la extracción de azitromicina en plasma</i>	31
5	<i>Técnica analítica para la extracción de azitromicina de muestras plasmáticas</i>	52
6	<i>Linealidad del Sistema (Promedio)</i>	55
7	<i>Linealidad del Método (Promedio)</i>	57
8	<i>Cromatogramas evidencia para la demostración de selectividad del método analítico</i>	66
9	<i>Perfil farmacocinético en voluntarios mexicanos sanos (Vía oral 500 mg/ AZM) Diferencia de género.</i>	72
10	<i>Ampliación al Perfil farmacocinético en voluntarios mexicanos sanos (Vía oral 500 mg/ AZM) Diferencia de género.</i>	72
11	<i>Perfil farmacocinético en voluntarios mexicanos sanos (Vía oral 500 mg/ AZM) Promedio.</i>	73
12	<i>Ampliación al Perfil farmacocinético en voluntarios mexicanos sanos (Vía oral 500 mg/ AZM) Promedio.</i>	73
13	<i>Gráfica de logaritmo de Cp vs tiempo para la Cp promedio de los 24 voluntarios.</i>	74





# *CAPITULO I*

*INTRODUCCIÓN Y  
OBJETIVOS*



## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La azitromicina es un compuesto semisintético derivado de la eritromicina, que pertenece al grupo de fármacos denominado macrólidos. Los macrólidos son antibióticos con actividad bacteriostática cuya eficacia máxima se manifiesta predominantemente contra cocos y bacilos Gram positivos aerobios.

Específicamente, el cambio químico desarrollado en Azitromicina lo ha hecho un compuesto más resistente a la degradación metabólica, lo que incrementa su tiempo de permanencia en el organismo. Ha demostrado ser muy activo contra microorganismos causantes de infecciones a nivel del tracto respiratorio inferior y superior, como es el caso de *Haemophilus influenzae* (causante de la meningitis) y algunas especies de *Campylobacter*. Además de actuar de manera efectiva contra especies de *Chlamydia* y *Neisseria gonorrhoeae* relacionadas con infecciones del tracto genital que se presentan concomitantemente con el SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida). (1)

A pesar de que azitromicina contenida en formas farmacéuticas orales se encuentra a la venta al público en nuestro país desde hace varios años, no existe información de carácter fisicoquímico y farmacocinético cuando es administrado in vivo, que permita conocer el comportamiento de este compuesto.

La literatura reporta algunos parámetros farmacocinéticos en poblaciones como la estadounidense, alemana e hindú. Sin embargo, estos datos varían de una población a otra,



lo que conduce a la idea de que probablemente el valor de estos parámetros sea distinto para la población mexicana. Pero no existe antecedente de un estudio que arroje como resultado la determinación de tales parámetros en la población mexicana. Por lo tanto, para proporcionar información que pueda servir para establecer el comportamiento farmacocinético de azitromicina en la población mexicana se hace necesario desarrollar un estudio que permita conocer dichos parámetros.

En general, el presente trabajo tiene como finalidad dejar como antecedente información tanto farmacocinética como analítica que pueda servir como herramienta para posteriores investigaciones relacionadas con la biodisponibilidad de azitromicina. Particularmente, se busca definir parámetros farmacocinéticos de este compuesto evaluado en población mexicana y establecer si el género afecta la biodisponibilidad de este fármaco.

## **OBJETIVO GENERAL**



- Ⓢ Determinar la influencia del género sobre la farmacocinética de Azitromicina después de una administración oral de 500 mg en voluntarios sanos provenientes de la población mexicana.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Ⓢ Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar Azitromicina en plasma utilizando una técnica de Cromatografía de líquidos de Alta Resolución (CLAR).
- Ⓢ Establecer si el género es un factor que puede afectar la farmacocinética de Azitromicina en la población mexicana.



*CAPITULO II*

*GENERALIDADES*



## CAPITULO II

### GENERALIDADES

Para comprender el presente trabajo es necesario definir el término farmacocinética.

La farmacocinética es el estudio de la evolución temporal de los niveles de los medicamentos en fluidos y tejidos, así como el empleo de las relaciones matemáticas necesarias para desarrollar modelos adecuados que permitan interpretar tales datos. En general los estudios farmacocinéticos ayudan a sustentar los mecanismos básicos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación. La realización de tales estudios ofrecen un camino para mejorar y optimizar un tratamiento terapéutico individual de los pacientes.

Los parámetros farmacocinéticos poseen diferentes puntos de aplicación, uno de ellos es en el desarrollo de estudios de biodisponibilidad donde se comparan algunos de éstos parámetros, obtenidos a partir de diferentes vías de administración. La biodisponibilidad es la cantidad y la velocidad a la que un principio activo es absorbido desde un producto farmacéutico y queda disponible en el sitio de acción, esto posterior a su administración en un organismo concreto. Como la definición indica, la biodisponibilidad comprende dos aspectos distintos: el cuantitativo, relacionado con la cantidad de fármaco que ingresa a la circulación general y el aspecto cinético, que señala la velocidad a la que ocurre este proceso.

Para determinar la biodisponibilidad de un fármaco administrado por vía oral se utilizan parámetros farmacocinéticos que se obtienen a partir de datos de concentración plasmática



del fármaco a distintos tiempos que van desde la fase de absorción, que es el tiempo cero sin fármaco en sangre, hasta la fase de eliminación que es el periodo durante el cual la concentración del fármaco en sangre disminuye hasta llegar a cero. Estos parámetros son la concentración máxima alcanzada ( $C_{max}$ ), el área bajo la curva (ABC), el tiempo al cual se alcanza la concentración plasmática máxima ( $t_{max}$ ) y el tiempo de vida media del fármaco ( $t_{1/2}$ ). Estos parámetros reflejan tanto el aspecto cuantitativo como cinético de la biodisponibilidad.

El ABC indica la cantidad total de fármaco absorbida, independientemente del tiempo al cual se produjo la absorción. La  $C_{max}$  representa la más alta concentración del fármaco en sangre después de la administración y es directamente proporcional a la cantidad absorbida. El tiempo máximo ( $t_{max}$ ) es el tiempo que se tarda en alcanzar la concentración máxima y está estrechamente relacionado con la velocidad de absorción. El tiempo de vida media del fármaco es el tiempo en el cual la mitad de la dosis administrada del fármaco es eliminada por el organismo.

Otros parámetros importantes en la caracterización farmacocinética de un fármaco son aquellos relacionados con el tipo de modelo al cual se ajusta el fármaco en cuestión. La azitromicina se ajusta a un modelo abierto de dos compartimientos (1), lo cual supone que al llegar la azitromicina a la circulación se distribuye con diferente velocidad a dos compartimientos comunicados entre sí, a uno de fácil acceso o principal y otro de mayor dificultad o periférico. Otra característica de éste modelo es que la eliminación ocurre con una cinética de primer orden (1).



De éste modelo derivan las constantes:  $\alpha$  (constantes de disposición rápida),  $\beta$  (constante de velocidad de eliminación de primer orden) y  $k_a$  (constante de velocidad de absorción de primer orden).

Con ayuda de los parámetros farmacocinéticos hasta ahora descritos podemos conocer el volumen de distribución aparente o  $V_d$  (constante de proporcionalidad que relaciona la cantidad de medicamento en el organismo, con la concentración plasmática del medicamento en cualquier tiempo durante la fase posterior a la distribución) y el aclaramiento o  $Cl$  (velocidad con la cual se elimina un medicamento).

Todos los parámetro anteriormente descritos pueden variar debido a diversos factores que pueden modificar la farmacocinética de los fármacos. Entre estos se encuentran los factores fisiológicos que están relacionados con el organismo y la especie en estudio, con modificaciones debidas al individuo como la edad, **género**, **raza**, morfotipo, estado nutricional, ritmos biológicos y factores genéticos. Muchas de estas modificaciones fisiológicas dependen de la raza y por lo tanto varían de una población a otra. Así también, la variabilidad biológica que existe entre hombres y mujeres afecta en muchos casos el comportamiento de un fármaco en el organismo. Todos los factores anteriores pueden modificar las distintas fases farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de tal forma que se afecte la biodisponibilidad.

De acuerdo a lo anterior, este estudio considera el supuesto de que el género y la diferencia poblacional son factores que pueden afectar la biodisponibilidad de un fármaco.





Particularmente, azitromicina requiere este estudio de caracterización farmacocinética porque no existe información al respecto en cuanto a la población mexicana se refiere y en los últimos años Azitromicina se ha convertido en fármaco ampliamente utilizado en México por su efectividad en la terapia de infecciones secundarias al SIDA provocadas por *Chlamydia* y *Neisseria gonorrhoeae* y por su efecto terapéutico duradero debido al amplio secuestro de este fármaco en los tejidos.

## 2.1 Estructura

La azitromicina es un macrólido semisintético que se origina químicamente por la inserción de un átomo de nitrógeno metil sustituido en el anillo lactona de la eritromicina A. Estas modificaciones estructurales mejoran su estabilidad en medio ácido y la penetración tisular y amplían el espectro de acción. (1,2)

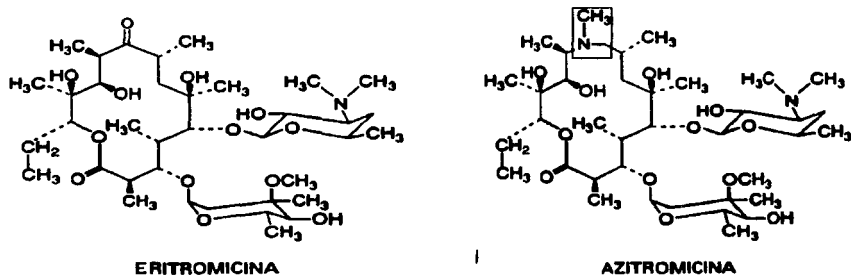


Figura 1 Estructura química de Eritromicina y Azitromicina. (1)



## 2.2 Propiedades fisicoquímicas

☉ Nombre químico:

☉ (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-dideoxi-3-C-metil-3-O-metil-a-L-ribo-hexopiranosil)oxi]-2-etil-3,4,10-trihidroxi-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-11-[[3,4,6-trideoxi-3-(dimetilamino)-b-D-xilo-hexopiranosil]oxi]-1-oxa-6-azaciclopentadecan-15-ona. (3)

☉ 9-Deoxo-9 a-aza-9 a-metil-9 a-homoeritromicina A. (2)

☉ Azitromicina.

☉ Fórmula:  $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$

☉ Peso molecular: 749.00 g/mol

☉ Aspecto: Cristales color blanco.

☉ Punto de fusión: 113 – 115 °C

☉ Espectro de absorción: Posee una débil absorción U.V. en un rango de longitud de onda bajo. (< 220 nm)

☉ Potencial de oxidación: +0.90 V.

☉ Nombres comerciales de azitromicina: CP-62993, XZ-450, Azitrocin, Sumamed, Trozocina, Zithromax, Zitromax. (4)



## **2.3 Farmacocinética**

### **2.3.1 Absorción**

Después de la administración oral, azitromicina se absorbe rápidamente. La biodisponibilidad disminuye en un 43% cuando se administra azitromicina con los alimentos (1). El área bajo la curva de Azitromicina no se ve afectada con la coadministración de un antiácido de hidróxido de aluminio o de magnesio, pero si disminuye su concentración plasmática máxima (3), ya que 2 horas después de una administración única de 500 mg tiene un valor de 0.4 µg/ml, aproximadamente. (1,5)

### **2.3.2 Distribución**

La azitromicina se distribuye ampliamente en todo el cuerpo, excepto en líquido cefalorraquídeo. La rápida distribución de azitromicina en los tejidos y su elevada concentración dentro de las células da como resultado una mayor concentración de azitromicina en tejidos que en plasma. La extensa distribución de este fármaco se confirma con el análisis de tejidos y fluidos (semen, próstata, ovarios, útero); pero no hay estudios controlados acerca del tratamiento con azitromicina para infecciones en estas partes del cuerpo y por lo tanto no se conoce la importancia clínica de la concentración de azitromicina en estos tejidos. (3)

El volumen de distribución de azitromicina es 31 L/kg y su unión a proteínas es de 51%, que disminuye cuando aumenta la concentración de azitromicina en el organismo. (1)



### **2.3.3 Metabolismo**

La azitromicina se metaboliza a través del mecanismo de primer paso (5), utilizando rutas hepáticas distintas al sistema del citocromo P450. (6) Se han encontrado concentraciones muy altas de fármaco inalterado en la bilis humana, junto con 10 metabolitos inactivos formados por N y O desmetilación, por hidroxilación de los anillos desoxamina y aglicona y por rompimiento del conjugado **cladinosa**; ej.: 9a-N-desmetil azitromicina y la descladinosa azitromicina, este último debido a hidrólisis ácida del enlace éter al azúcar cladinosa neutra. (5,2) En otros estudios de carácter microbiológico, se sugiere que los metabolitos no juegan ningún papel en la actividad microbiológica de la azitromicina. (2)

### **2.3.4 Eliminación**

Este fármaco se excreta principalmente en las heces a través de la bilis y por medio de la secreción transintestinal. (7) Después de una semana, aproximadamente el 6% de la dosis administrada aparece intacta en la orina. (7,3,1) Azitromicina tiene una aclaración plasmática de 630 mL/min (3) y una vida media de 22 horas debidas al prolongado secuestro del fármaco en los tejidos.(1)

### **2.4 Farmacodinamia**

La azitromicina se une de manera reversible a la subunidad ribosomal 50 S de microorganismos susceptibles interfiriendo de esta manera con la síntesis microbiana de proteínas. El fármaco bloquea la fase de translocación en el sitio A evitando que el péptido recién formado se desplace al sitio P o donador. (Figura 2)

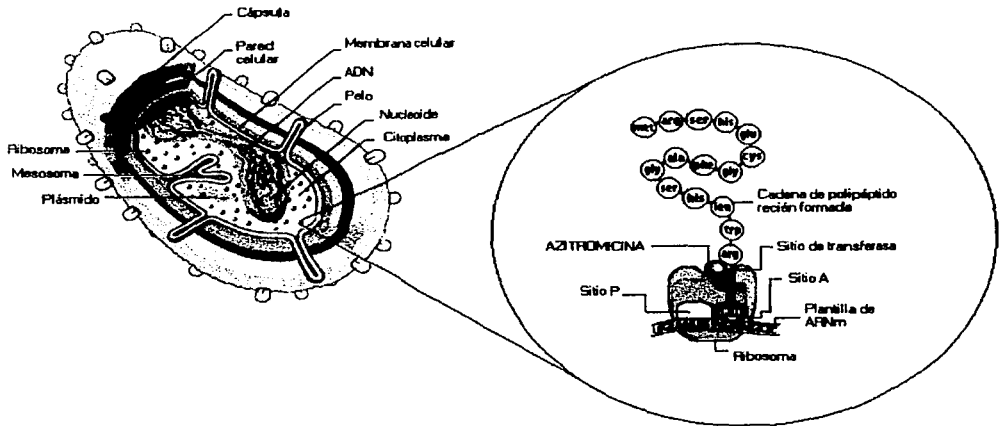


Figura 2 Mecanismo de Acción de Azitromicina.

Los microorganismos permiten más fácilmente el paso a su interior de la forma no ionizada de azitromicina, por lo tanto, la mayor acción antimicrobiana se observa a un pH alcalino. (1)

## 2.5 Indicaciones terapéuticas

La azitromicina esta indicada en infecciones del tracto respiratorio inferior que incluyen bronquitis, neumonía y del tracto respiratorio superior como sinusitis y faringoamigdalitis, causadas por Haemophilus influenzae, Legionella pneumophila y otros bacilos Gram negativos. Es muy utilizada para la erradicación de los estreptococos de la **orofaringe**. (1,2)

De particular interés es que la azitromicina es efectiva en el tratamiento de infecciones del tracto genital debidas a Neisseria gonorrhoeae y a Chlamydia trachomatis



incluyendo enfermedades como **tracoma, linfogranuloma venéreo, cervicitis y uretritis inespecífica**, pero no se encuentra indicada en infección concomitante por *Treponema pallidum*.(2)

Este fármaco posee actividad contra *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* y especies de *Plasmodium*. Estas especies provocan toxoplasmosis y otras infecciones muy comunes en individuos con SIDA, por lo cual se encuentra indicado para este tipo de enfermos. (1)

En la tabla 1 se muestra la actividad bacterial de azitromicina y las enfermedades que causan estos microorganismos.

**Tabla 1 Microorganismos y enfermedades contra los que Azitromicina muestra actividad.**

GRUPO	MICROORGANISMO	ENFERMEDAD
Bacterias Gram positivas	<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	Infecciones de las vías respiratorias.
	<u><i>Streptococcus pyogenes</i></u>	Faringitis, escarlatina y erisipelas.
	<u><i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	Neumonía.
	<u><i>Corynebacterium diphtheriae</i></u>	Difteria.
Bacterias Gram negativas	<u><i>Haemophilus influenzae</i></u>	Meningitis, Enfermedad Pulmonar crónica, infecciones el tracto respiratorio inferior, bacteriemia, otitis media
	<u><i>Moraxella catarrhalis</i></u>	Otitis media, infecciones respiratorias.
	<u><i>Bordetella pertussis</i></u>	Tosferina.
	<u><i>Legionella pneumophila</i></u>	Enfermedad de los legionarios (Neumonía)
	<u><i>Pasteurella multocida</i></u>	Infección de heridas (mordeduras de animales), abscesos, bacteriemia, meningitis.
	<u><i>Fusobacterium necrophorum</i></u>	Síndrome de Lemierre (septicemia posquirúrgica)



GRUPO	MICROORGANISMO	ENFERMEDAD
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorrea, infecciones del tracto genital
	Especies de <i>Campylobacter</i>	Gastroenteritis, diarrea,
Espiroquetas	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Enfermedad de Lyme. Eritema crónico-migratorio-piel.
Bacilos ácido-resistentes	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	Encefalitis por toxoplasmosis enfermedad diseminada en SIDA.
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Neumonía atípica
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Linfogranuloma venéreo, tracoma, conjuntivitis por inclusión, uretritis inespecífica, cervicitis.
Otros microorganismos.	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Neumonía
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Infección relacionada con la ingesta de leche no pasteurizada.
	<i>Cryptosporidium</i>	Diarrea en enfermos de SIDA.

## 2.6 Efectos adversos

La azitromicina es bien tolerada con una baja frecuencia de efectos colaterales. La mayoría de estos efectos son de origen gastrointestinal, observándose ocasionalmente anorexia, náuseas, vómito, diarrea (rara vez causando deshidratación), heces blandas, dispepsia, malestar abdominal (dolor, cólicos) y flatulencia. Algunas otras molestias que han llegado a presentarse son mareos, vértigo, cefalea y somnolencia. Ha habido informes de deterioro auditivo, incluyendo pérdida de la audición, sordera y/o tinnitus en algunos pacientes que recibieron azitromicina. Muchos de éstos han sido asociados con el uso prolongado de dosis elevadas en estudios de investigación. En tales casos, cuando la información de seguimiento estuvo disponible, la mayoría de los eventos fueron reversibles.



Algunos casos reportados refieren **nefritis intersticial** e insuficiencia renal aguda y otros presentaron anomalías en la función hepática incluyendo hepatitis e **ictericia colestática**. En los estudios clínicos ocasionalmente se han observado episodios transitorios de **neutropenia** leve, aunque no se ha establecido una relación causal con azitromicina. Existen individuos que han desarrollado reacciones alérgicas que incluyen "rash", fotosensibilidad, **artralgia**, edema, urticaria, **angioedema** y anafilaxia (rara vez fatal) .

Así también, se han presentado palpitaciones y arritmias, incluyendo taquicardia ventricular (al igual que con otros macrólidos) aunque su relación causal con azitromicina no ha sido determinada.

Rara vez han ocurrido reacciones cutáneas serias, incluyendo eritema multiforme, **síndrome de Stevens-Johnson** y **necrólisis epidérmica tóxica**. Se ha informado **astenia** y **parestesia** pero no se ha establecido una relación causal. (2)

### **2.7 Interacciones con otros fármacos**

Existen algunos fármacos que han reportado alguna interacción de azitromicina y con los cuales se debe tener precauciones al momento de la administración concomitante de este macrólido. (2,3) Estos fármacos se mencionan en la tabla 2.

*Tabla 2 Interacciones de Azitromicina con otros fármacos*

<b>FÁRMACO</b>	<b>INTERACCIÓN</b>	<b>PRECAUCIÓN</b>
Antiácidos	Disminución de la concentración de Azitromicina sérica máxima hasta en un 30%.	No ingerir en forma simultánea





FÁRMACO	INTERACCIÓN	PRECAUCIÓN
Digoxina	Azitromicina altera el metabolismo microbiano de Digoxina	Digoxina puede alcanzar concentraciones elevadas.
Derivados del ergot	Ergotismo	Evitar uso concomitante de Azitromicina.
Teofilina	Parece incrementar los niveles séricos de Teofilina.	Monitoreo de los niveles plasmáticos de Teofilina.
Triazolam	Disminución del aclaramiento de Triazolam y el incremento de su efecto farmacológico	Vigilancia.
Zidovudina	Reducción del tiempo requerido por Azitromicina para alcanzar la concentración máxima.	
Fármacos metabolizados por el sistema del citocromo p450 (carbamazepina, ciclosporina, hexobarbital, fenitoína)	Elevación de los niveles séricos de estos fármacos.	Vigilancia.

## 2.8 Datos preclínicos de seguridad

En algunos estudios previos realizados en animales se administraron dosis elevadas de azitromicina y se apreció que puede causar fosfolipidosis reversible, generalmente sin consecuencias toxicológicas perceptibles. No hay evidencia de que esto pueda aplicarse en el curso del empleo normal de la azitromicina en humanos. (2)

## 2.9 Contraindicaciones

El uso de azitromicina está contraindicado en pacientes con antecedentes de reacciones alérgicas a la azitromicina o a cualquiera de los antibióticos macrólidos.



## **2.10 Precauciones**

### **2.10.1 Precauciones generales**

Rara vez se ha informado de reacciones alérgicas serias, que incluyen **angioedema** y anafilaxia. En pacientes con insuficiencia renal leve (depuración de creatinina mayor a 40 ml/minuto), no se necesita ajustar la dosis, sin embargo no existen datos respecto al uso de azitromicina en pacientes con daño renal más severo, por lo que el empleo de este antibiótico debe hacerse con precaución en estos pacientes.

De la misma manera, la azitromicina deberá administrarse bajo vigilancia a pacientes con enfermedad hepática significativa. En pacientes con insuficiencia hepática leve o moderada no hay evidencia de cambios en la farmacocinética de la azitromicina en suero y no es recomendable un ajuste de dosis en estos casos. En pacientes que reciben derivados del ergot, la coadministración de algunos antibióticos macrólidos ha dado lugar a la aparición de ergotismo.

No existen datos respecto a la posibilidad de una interacción entre los derivados del ergot y la azitromicina. Sin embargo, debido a la posibilidad teórica del ergotismo, no deberán administrarse conjuntamente azitromicina y derivados del ergot. Al igual que con cualquier preparación antibiótica, se recomienda la vigilancia de la aparición de signos de superinfección por organismos no susceptibles, incluyendo hongos. (2)



### **2.10.2 Durante el embarazo y la lactancia**

Los estudios de reproducción animal han demostrado que la azitromicina atraviesa la placenta, pero no revelaron evidencia de daño al feto. No existen datos acerca de la secreción en la leche y no se ha establecido la seguridad para su uso durante el embarazo y la lactancia. Por lo tanto, sólo deberá utilizarse azitromicina en la mujer embarazada o lactando cuando no existan alternativas adecuadas disponibles. (2)

### **2.11 Efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y fertilidad**

No se han llevado a cabo estudios en animales a largo plazo para evaluar el potencial carcinogénico. La azitromicina no ha mostrado potencial mutagénico en las pruebas de laboratorio habituales, prueba de linfoma en el ratón, prueba clastogénica en linfocitos humanos y en médula ósea del ratón. (2)

### **2.12 Presentaciones farmacéuticas de azitromicina disponibles en México**

En la *tabla 3* se esquematizan las presentaciones farmacéuticas de azitromicina disponibles en México, en donde se detalla la forma farmacéutica, la vía de administración y la dosis.



Tabla 3 Presentaciones farmacéuticas de azitromicina disponibles en México

**AZITROCIN. Pfizer, S.A. de C.V.**

FORMA FARMACÉUTICA	VIA DE ADMINISTRACIÓN	DOSIS												
Tableta Dihidrato de Azitromicina equivalente a 500 mg de Azitromicina base. Caja con 3 tabletas.	Oral	Adultos: 500 mg al día por tres días.  Niños: Sólo a niños que pesen más de 45 kg misma dosis que adulto.												
Suspensión Dihidrato de Azitromicina equivalente a 200 mg de Azitromicina base Frasco con polvo para 15 ml (600 mg) conteniendo 200mg/5 ml.	Oral	Adultos: 500 mg al día por tres días.  Niños: Según peso, doses diarias por tres días.												
Suspensión Dihidrato de Azitromicina equivalente a 200 mg de Azitromicina base. Frasco con polvo para 22.5 ml (900mg) conteniendo 200 mg/5 ml.	Oral	<table border="1"> <thead> <tr> <th>PESO (kg)</th> <th>DOSIS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>&lt; 15</td> <td>10 mg/kg</td> </tr> <tr> <td>15 - 25</td> <td>200 mg (5.0 ml)</td> </tr> <tr> <td>25 - 35</td> <td>300 mg (7.5 ml)</td> </tr> <tr> <td>35 - 45</td> <td>400 mg (10 ml)</td> </tr> <tr> <td>&gt; 45</td> <td>Misma dosis que adulto</td> </tr> </tbody> </table>	PESO (kg)	DOSIS	< 15	10 mg/kg	15 - 25	200 mg (5.0 ml)	25 - 35	300 mg (7.5 ml)	35 - 45	400 mg (10 ml)	> 45	Misma dosis que adulto
PESO (kg)	DOSIS													
< 15	10 mg/kg													
15 - 25	200 mg (5.0 ml)													
25 - 35	300 mg (7.5 ml)													
35 - 45	400 mg (10 ml)													
> 45	Misma dosis que adulto													

**AZITROCIN – G. Pfizer, S.A. de C.V.**

FORMA FARMACÉUTICA	VIA DE ADMINISTRACIÓN	DOSIS
Tableta Dihidrato de Azitromicina equivalente a 500 mg de Azitromicina base. Caja con 4 tabletas.	Oral	Adultos: 1g como dosis única.

**2.13 Métodos de extracción reportados para azitromicina**

A continuación se presentan algunos de los procesos de extracción encontrados en la bibliografía y que de alguna forma contribuyeron al desarrollo de una técnica eficiente para la extracción de azitromicina.



© En un trabajo realizado por Shepard, R.M. y Duthu, G.S. hacia 1991 (8), se reportó la extracción de azitromicina a partir de alícuotas de 1mL de plasma, a las cuales se les adicionó 0.25µg de Estándar interno (E.I). A continuación esta muestra fue alcalinizada con 1mL de carbonato de potasio (0.03 M) y agitada. Posteriormente se realizó la extracción con 5mL de terbitul-metil-éter por 30 segundos, al final de éste tiempo la muestra fue centrifugada a 2000rpm por 10 minutos. La fase etérea se transfirió a un tubo limpio y se evaporó a 37°C. El residuo obtenido se reconstituyó en 0.3mL de fase móvil (acetonitrilo - agua 1:1 v/v). Finalmente la muestra se lavó con 0.3mL de hexano, la fase acuosa fue vertida en un vial limpio para realizar una inyección de 100µL.

© Por su parte Mehendre R.P. y Tipnis H.P. (9) reportaron en 1995 un método de extracción, donde se partió de una alícuota de plasma, a la cual se le agregaron 50 µg/mL de eritromicina, como E.I. Esta muestra se llevó a condiciones alcalinas por medio de una solución amortiguadora de fosfatos (pH 8.5). A continuación se realizó la extracción con 5 mL de cloruro de metileno, se agitó la muestra y se centrifugo a 2000 rpm por 10 minutos. La fase orgánica se evaporó a sequedad bajo flujo de nitrógeno. Finalmente el residuo se disolvió en 2 mL de fase móvil (solución de acetato de amonio 0.1M, acetonitrilo y metanol 30:47:23), para después inyectarlo en la columna.

© En otra técnica de extracción reportada por Sastre J. (1998) (10), se tomó 1 mL de plasma al cual se le adicionaron 20 µL de roxitromicina como E.I. y 200 µL de una solución de carbonato de sodio (0.5 g/mL con un pH aproximado de 12). A continuación la muestra se



mezcló por 10 segundos, al final de éste tiempo se realizó la extracción con 6 mL de dietil-éter, se agitó la mezcla por 15 minutos, y posteriormente se centrifugo la muestra a 2700 rpm por 5 minutos. La muestra se dejó congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un baño de etanol, luego se transfirió la fase orgánica a un tubo limpio para ser evaporada a  $40^{\circ}\text{C}$  bajo flujo de nitrógeno. El residuo obtenido se disolvió en 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo para inyectarlo en CLAR.

© Kees F.; et.al en 1998 (4), publicaron como parte de un trabajo con macrólidos, el siguiente proceso de extracción. A una muestra de plasma de 500  $\mu\text{L}$  se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio (0.1 M) y 3 mL de terbutil-metil-éter, después de mezclar la muestra y centrifugarla, se colocó en nitrógeno líquido por algunos segundos o se puso a congelación ( $-70^{\circ}\text{C}$ ). A continuación se retiró la fase acuosa y se disolvió con 250  $\mu\text{L}$  de una solución 1:1 de metanol – agua.



*CAPITULO III*

*METODOLOGÍA  
EXPERIMENTAL*



## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Este capítulo tiene por objetivo mostrar las estrategias de trabajo seguidas a través del protocolo empleado en las diferentes etapas del **ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE AZITROMICINA EN POBLACIÓN MEXICANA**, es por ello que se encuentra dividido de la siguiente forma:

- 3.1 Desarrollo de un método analítico para cuantificar azitromicina de muestras plasmáticas por medio de CLAR.
- 3.2 Validación del método analítico de cuantificación de azitromicina de muestras plasmáticas por medio de CLAR.
- 3.3 Diseño del estudio clínico en voluntarios mexicanos saludables.
- 3.4 Procedimiento para el análisis de las muestras y criterios de control durante el análisis.
- 3.5 Cálculo de los parámetros farmacocinéticos de azitromicina en población mexicana.
- 3.6 Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos





### 3.1 Desarrollo de un método analítico para cuantificar azitromicina en muestras plasmáticas por medio de CLAR.

#### 3.1.1 Material y equipo empleado.

##### Sustancias de referencia:

- Ⓢ **Azitromicina:** Azitromicina cristalina anhidra, (estándar secundario)  
(Laboratorios Silanes, lote: 11QU1AP120101)
- Ⓢ **Claritromicina:** Claritromicina cristalina, grado analítico (estándar secundario)  
(Laboratorios Kendrick , lote: ES-C-008, pureza 96.2%)

##### Reactivos:

Acetonitrilo	$\text{CH}_3\text{CN}$	J.T. Baker
Etil-metil-éter	$(\text{CH}_3)_2\text{COCH}_2$	J.T. Baker
Hexano	$\text{C}_6\text{H}_{14}$	J.T. Baker
Metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$	J.T. Baker

Además de los reactivos anteriores se empleó una matriz de plasma humano que fue proporcionada por el Hospital Español, las características de ésta matriz plasmática corresponden al control de calidad interno de dicha institución.



Equipo para CLAR:

Bomba cuaternaria con desgasificador (modelo 600 Cotrolled)

Detector electroquímico (DECADE - Waters)

**3.1.2 Soluciones empleadas**

Solución amortiguadora de fosfatos (0.05M , pH= 7.20):

Para preparar un litro, pesar 7.093 g de fosfato de sodio dibásico (P.M. 141.86 g/mol) y transferir a un matraz volumétrico de un litro. Disolver con un volumen mínimo de agua calidad HPLC y llevar a volumen con la misma. Ajustar el pH con ácido o-fosforico, filtrar a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.2 $\mu$ m y desgasificar con vacío por 15 minutos.

Solución Estándar de Azitromicina:

Solución A1 de Azitromicina (20  $\mu$ g/mL): Pesar con exactitud 0.0200 g de azitromicina, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y disolver en un volumen mínimo de metanol (HPLC), posteriormente llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v). Tomar 25 mL de la solución anterior con ayuda de una pipeta volumétrica y transferir a un matraz volumétrico de 250 mL, llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v).



Solución A2 de **Azitromicina (5  $\mu\text{g/mL}$ )**: Pesar con exactitud 0.0100 g de azitromicina, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y disolver en un volumen mínimo de metanol (HPLC), posteriormente llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v). Tomar 0.5 mL de la solución anterior con ayuda de una pipeta volumétrica y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v).

Solución A3 de **Azitromicina (0.5  $\mu\text{g/mL}$ )**: Tomar 1 mL de la solución A2 con ayuda de una pipeta volumétrica y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v).

**Soluciones Estándar de Claritromicina:**

Solución C1 de **Claritromicina (200  $\mu\text{g/mL}$ )**: Pesar con exactitud 0.0200 g de claritromicina, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y disolver en un volumen mínimo de metanol (HPLC), posteriormente llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v) y agitar.

Solución C2 de **Claritromicina (20  $\mu\text{g/mL}$ )**: Tomar 25 mL de la solución C1 con ayuda de una pipeta volumétrica y transferir a un matraz volumétrico de 250 mL, llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v) y agitar.



**Solución para evaluar la Adecuabilidad del Sistema:**

Solución S1 de Claritromicina (20  $\mu\text{g/mL}$ ): Pesar con exactitud 0.0200 g de claritromicina y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver en un volumen mínimo de metanol (HPLC), posteriormente llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v) . Tomar 25 mL de la solución anterior con ayuda de una pipeta volumétrica, transferir a un matraz volumétrico de 250 mL y llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v).

Solución S2 de Azitromicina (2400 ng/mL): Pesar con exactitud 0.0100 g de azitromicina y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver en un volumen mínimo de metanol (HPLC), posteriormente llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v) . Tomar 60 mL de la solución anterior con ayuda de algunas pipetas volumétricas y transferir a un matraz volumétrico de 250 mL Llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v). Finalmente con ayuda de una pipeta volumétrica transferir 10 mL de ésta solución, a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v).

Solución S3 de Azitromicina (0.6  $\mu\text{g/mL}$ ) y Claritromicina (5  $\mu\text{g/mL}$ ): Tomar 25 mL de la solución S1 y 25 mL de la solución S2 con ayuda de unas pipetas volumétricas y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo agua (40:60 v/v) . Etiquetar como: **Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema.**



### Solución de Hidróxido de Sodio (1N):

Para preparar un litro de esta solución pesar 40 g de hidróxido de sodio y trasladar a un matraz volumétrico de un litro. Disolver en un volumen mínimo de agua calidad HPLC y llevar a volumen con la misma.

### **3.1.3 Selección de las condiciones cromatográficas para la cuantificación de azitromicina a través de CLAR.**

El primer paso en esta etapa comprendió la evaluación de las propiedades fisicoquímicas de azitromicina registradas en la literatura, tales como: estructura química, solubilidad, propiedades ácido base y potencial de oxidación. En base a dichas propiedades y después de realizar una revisión minuciosa de algunos métodos analíticos similares (4,8,9,10,11,12), se decidió realizar el análisis por medio de CLAR.

### Selección de un detector:

Para elegir el detector más adecuado se tomaron en cuenta algunos factores, por ejemplo: disponibilidad del equipo, complejidad de la técnica, duración de la técnica y sensibilidad del equipo. Debido a las características estructurales de azitromicina se requirió de un detector que presentara una elevada sensibilidad. Es por ello que se utilizó un detector electroquímico DECADE ®.

En estudios previos de azitromicina (10,6,8) se registró el empleo de un potencial de oxidación de +0.90 V empleando un electrodo de trabajo de carbono vidriado y un electrodo



de referencia de Ag/AgCl. Con el fin de aumentar la sensibilidad del detector se empleó un electrodo de hidrógeno como electrodo de referencia (Hy-REF-Water), con el cual se reajustó el potencial de trabajo hasta +0.84 V, en un detector electroquímico DECADE (Waters).

### Selección de la columna:

Con base en las propiedades fisicoquímicas y estructurales de azitromicina, además de los datos encontrados en la literatura (10,5,6,8,1) se decidió probar con columnas para cromatografía de fase reversa (C<sub>18</sub>). Se tomaron como criterios para evaluar la eficiencia de cada columna los siguientes parámetros:

- Ⓒ Un tiempo de retención ( $t_r$ ) para azitromicina, el cual no debe encontrarse alterado por compuestos desconocidos.
- Ⓒ Un factor de capacidad ( $k'$ ), comprendido entre  $2 < k' < 10$ , que indica el grado de retención entre fase estacionaria y fase móvil.
- Ⓒ Una simetría de picos  $\leq 2.0$ .
- Ⓒ Resolución de picos  $\geq 1.5$ , valor que muestra una separación adecuada entre picos.

Las columnas evaluadas para cromatografía en fase reversa fueron:

- i) YMC-Pack ODS-AP (250 x 6.0 mm) 5 $\mu$ m
- ii) X-Terra RP<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm) 5 $\mu$ m



### Selección de una fase móvil:

Entre las variables que permitieron la selección de la fase móvil se encuentran: propiedades fisicoquímicas de algunos posibles eluentes, proporción (cuando se trata de mezclas) y composición (cuando se trata de soluciones amortiguadoras, donde se toma en cuenta la naturaleza de la sal, concentración y pH de la solución). La eficiencia entre distintos tipos de fase móvil se determinó por medio de la comparación de los parámetros cromatográficos señalados anteriormente (tiempo de retención, factor de capacidad, simetría y resolución de picos) y se consideró adecuada aquella fase móvil que por sus propiedades, permitiera cuantificar el compuesto de interés de forma clara, precisa y sin interferencias debidas a la misma.

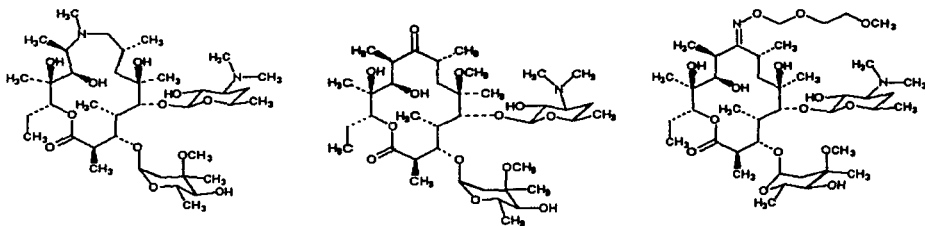
### Selección del Estándar Interno (E.I.):

Para disminuir los errores asociados con el procesamiento de las muestras se decidió emplear un **estándar interno (E.I.)**. Para seleccionar el compuesto apropiado se analizó un conjunto de compuestos con características estructurales y propiedades fisicoquímicas (potencial de oxidación) similares al compuesto de interés. También se determinó cual de estos compuestos presentaba los parámetros cromatográficos más apropiados para realizar la cuantificación del compuesto de interés. Dichos parámetros comprendieron: tiempo de retención, factor de capacidad, simetría y resolución de picos. Después de realizar un análisis de otros trabajos que emplean E.I. como parte del proceso de cuantificación de azitromicina, se decidió probar:



(a) Roxitromicina

(b) Claritromicina



*Figura 3 : De izquierda a derecha se presenta la estructura de Azitromicina, Claritromicina y Roxitromicina, observe la gran similitud que presentan las estructuras moleculares de éstos compuestos.*

Selección de una solución de prueba:

Con la finalidad de evaluar la eficiencia de cada uno de los parámetros antes seleccionados respecto a azitromicina y al E.I. seleccionado, se decidió preparar una solución con ambas sustancias, **solución para evaluar la adecuabilidad del sistema** (600ng/mL de azitromicina y 5000ng/mL de claritromicina). Para ello se tomó en cuenta el valor  $C_{max}$  de azitromicina.





### **3.1.4 Desarrollo de una técnica analítica para la extracción de azitromicina de muestras plasmáticas.**

Con fundamento en las propiedades fisicoquímicas de azitromicina y el análisis de algunas técnicas de extracción reportadas en artículos (4,8,9,10), se desarrolló una técnica de extracción que permitiera separar tanto azitromicina como el E.I. de la matriz biológica.

Durante el desarrollo de dicha técnica se tomó en cuenta el cumplimiento de los siguientes puntos:

- ☉ Obtener la mayor recuperación posible de azitromicina.
- ☉ Eliminar las posibles interferencias.

La *figura 4* presenta las etapas de la estrategia desarrollada para la extracción del fármaco en muestras plasmáticas y reseña las distintas variables que fueron probadas para determinar las mejores condiciones de extracción.

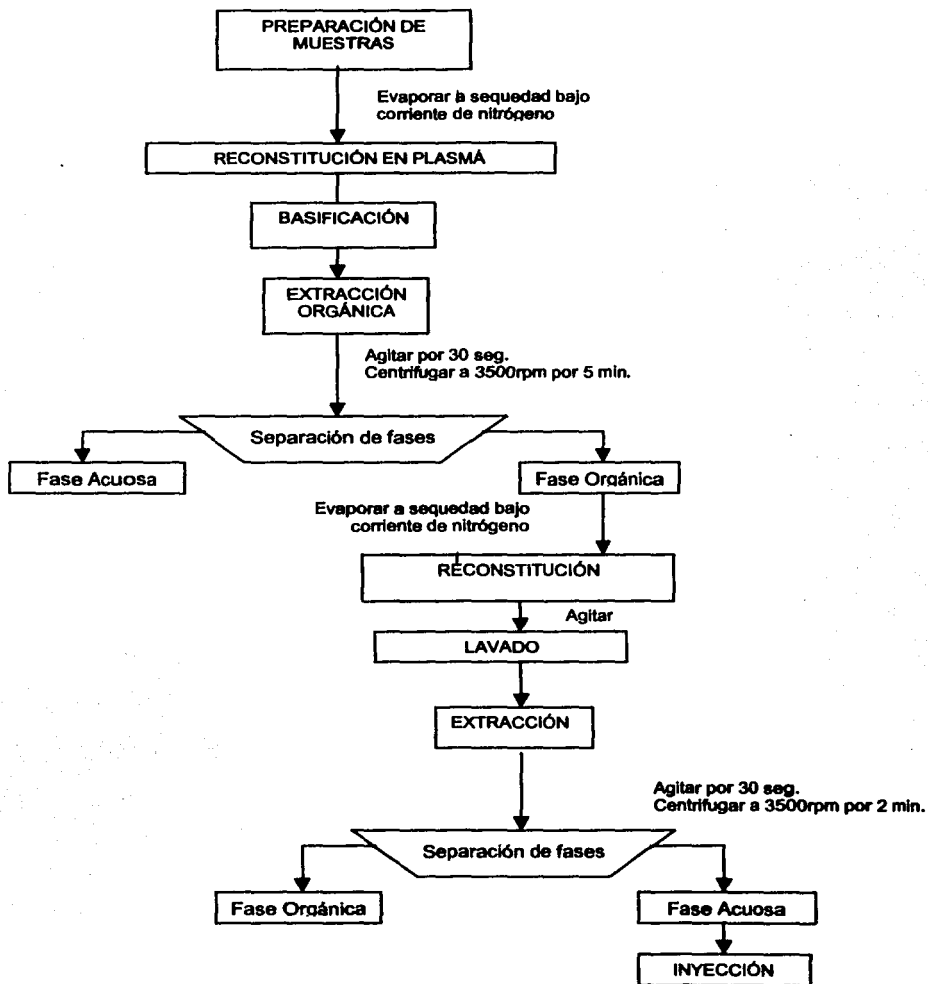
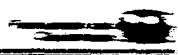


Figura 4 Etapas de técnica analítica para la extracción de azitromicina en plasma.



VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CLAR

Para validar el método en este método analítico se consideraron los parámetros convencionales en química, como: precisión y exactitud, sensibilidad y especificidad de acuerdo al método establecido; límites de detección y cuantificación y considero como de una validación. A continuación se muestra la metodología utilizada para validar cada uno de los puntos que se mencionan y se describen la validación.

**3.2.0 Adecuabilidad del Sistema**

Para verificar el buen funcionamiento del equipo (CLAR y DECADE) durante el estudio, antes de cada corrida se inyectó por quintuplicado en el sistema cromatográfico la solución para evaluar la adecuabilidad del sistema (0.8 µg/mL de azitromicina y 5 µg/mL de claritromicina), para obtener registros continuos que presenten repetibilidad en parámetros tales como: resolución, colores, tiempo de retención y el coeficiente de variación de la respuesta (altura); el cual no debe ser mayor al 2%. Se realizó el análisis de dichos parámetros con ayuda del programa Millenium - Waters versión 3.2.

**3.2.1 Validación del Sistema:**

**3.2.1.1 Linealidad**

Para evaluar la linealidad del sistema, se preparó por duplicado una solución de azitromicina (20 µg/mL); a partir de cada solución se elaboró una curva con las siguientes concentraciones: 20, 30, 75, 100, 200, 500 y 1000 ng/mL. Se adicionó a cada muestra un



volumen suficiente de una **solución de claritromicina (200 µg/mL)** para obtener una concentración final equivalente a 4000 ng/mL. Para elaborar éstas muestras se usó la *Tabla 4* que presenta la preparación de dichas muestras (**fase móvil y azitromicina**) con E.I. Se inyectaron éstas muestras en CLAR para su análisis.

*Tabla 4 Preparación de muestras para la evaluación del sistema.*

Concentración Nominal (ng/ml)	Volumen Agregado de sol. 200 µg/mL de Claritromicina (µL)	Volumen Agregado de sol. 200 µg/mL de Claritromicina (µL)	Volumen Agregado de sol. 200 µg/mL de Claritromicina (µL)
20	20	200	10
30	30	200	10
50*	50	200	10
75	75	200	10
100	100	200	10
200	200	200	10
400*	400	200	10
500	500	200	10
750*	750	200	10
1000	1000	200	10

Nota: \*Corresponde a la preparación de muestras control.

A partir de los resultados obtenidos se graficó la respuesta con respecto a la concentración de azitromicina para cada una de las curvas. Para cumplir con este rubro el **coeficiente de regresión (r)** debe ser mayor o igual que 0.99 y el **error debido a la regresión (EDAR%)** no mayor al 2%.

Error relativo debido a la regresión (Sy/x, r)

$$= \frac{\sqrt{\frac{\Sigma y^2 - A\Sigma y - B\Sigma xy}{n-2}}}{y}$$



### 3.2.1.2 Precisión:

A partir de los datos de linealidad se evaluó la precisión del sistema, para ello se calculó el **coeficiente de variación del factor de respuesta (CVFR%)** de todos los puntos, dicho parámetro no debe ser mayor al 2% para asegurar el cumplimiento de éste rubro.

$$\text{Factor de Respuesta (FR)} = \frac{\text{Respuesta o propiedad medida (y}_i\text{)}}{\text{Concentración Patrón (x}_i\text{)}}$$

Una vez obtenidos los datos de linealidad y precisión del sistema se eligió el tipo de respuesta más adecuada para continuar con el estudio (**relación de alturas de azitromicina y claritromicina**).

### 3.2.2 Validación del Método

Para elaborar las muestras empleadas en la validación del método, se utilizaron las *Tablas 4, 5, y 6* que presentan la preparación de dichas muestras. Se adicionó a todas las muestras de la validación un volumen de **solución de claritromicina (200 µg/mL)** (*Tablas 5, 6 y 7 según corresponda*) para obtener una concentración de claritromicina final equivalente a 4000 ng/mL. Después de aplicar el proceso de extracción seleccionado (Ver figura 5), todas las muestras fueron inyectadas en el sistema cromatográfico para su análisis.



**Tabla 5 Preparación de muestras para la evaluación del método (parte 1)**

Concentración Nominal (ng/ml)	Volumen Agregado de sol. 20 µg/mL de Claritromicina (µL)	Volumen Agregado de sol. 20 µg/mL de Claritromicina (µL)	Volumen Agregado de sol. 20 µg/mL de Claritromicina (µL)
20	20	50	500
30	30	50	500
50	50	50	500
75	75	50	500
100	100	50	500

Nota: Evaporar a sequedad las muestras antes de adicionar el plasma.

**Tabla 6 Preparación de muestras para la evaluación método (parte 2)**

Concentración Nominal (ng/ml)	Volumen Agregado de sol. 20 µg/mL de Claritromicina (µL)	Volumen Agregado de sol. 20 µg/mL de Claritromicina (µL)	Volumen Agregado de sol. 20 µg/mL de Claritromicina (µL)
200	20	50	500
400	40	50	500
500	50	50	500
750	75	50	500
1000	100	50	500

Nota: Evaporar a sequedad las muestras antes de adicionar el plasma.

### 3.2.2.1 Rango:

Se estimó el rango en función del intervalo esperado de concentraciones de azitromicina en las muestras de voluntarios. El rango debe incluir concentraciones desde un límite de cuantificación hasta una concentración máxima. Se tomó en cuenta los parámetros farmacocinéticos ( $C_{max}$ ) de azitromicina.

### 3.2.2.2 Recuperación Absoluta:

Para conocer el porcentaje de recuperación absoluta, se preparó por triplicado una solución de azitromicina (5 µg/mL) y a partir de cada solución se elaboró una serie de tres



muestras con las siguientes concentraciones: 50, 400 y 750 ng/mL. Para elaborar éstas muestras se utilizaron las *Tablas 5 y 6* que presentan la preparación de dichas muestras (**plasma y azitromicina**) con E.I. y se aplicó el proceso de extracción seleccionado (ver figura 5).

Posteriormente, se preparó por triplicado una **solución de azitromicina (20 µg/mL)** y a partir de cada solución se elaboró una serie de tres muestras con las siguientes concentraciones: 50 , 400 y 750 ng/mL. Para elaborar éstas muestras se usó la *Tabla 5* que presenta la preparación de dichas muestras (**fase móvil y azitromicina**) con E.I.

Finalmente se comparó la respuesta obtenida por las muestras en matriz biológica y las muestras en fase móvil a cada nivel de concentración. El porcentaje de ésta razón no tiene que ser necesariamente del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración.

### 3.2.2.3 Linealidad:

Para evaluar la linealidad del método, se preparó por triplicado una **solución de azitromicina (5 µg/mL)**; a partir de cada solución se elaboró una curva con las siguientes concentraciones: 20, 30, 75, 100, 200, 500 y 1000 ng/mL (ver tabla 5 y 6, y figura 5)

Se evaluó la linealidad de cada curva (concentración nominal versus respuesta) por medio del coeficiente de regresión lineal  $r$ , mismo que debía ser mayor o igual a 0.99.



#### 3.2.2.4 Precisión:

Se evaluó la precisión del método a través de la repetibilidad y la reproducibilidad del mismo.

##### 3.2.2.4.1 Repetibilidad:

Para realizar el análisis de éste rubro, se preparó por quintuplicado una **solución de azitromicina (5 µg/mL)**; a partir de cada solución se elaboraron tres muestras con las siguientes concentraciones: 50, 400 y 750 ng/mL (ver tabla 5 y 6, y figura 5).

Una vez obtenidos los datos de concentración recuperada por cada muestra, se agruparon los valores por nivel de concentración, posteriormente se calculó el **coeficiente de variación** para cada grupo de muestras; el valor del coeficiente de variación debe ser menor al 15% en todos los casos.

##### 3.2.2.4.2 Reproducibilidad:

Se preparó en un mismo día por duplicado una **solución de azitromicina (5 µg/mL)**; a partir de cada solución se elaboraron tres muestras con las siguientes concentraciones: 50, 400 y 750 ng/mL (ver tabla 5 y 6, y figura 5). Este proceso se repitió por dos días más.

Se obtuvieron todos los datos de concentración recuperada para cada muestra y se agruparon los datos según el nivel de concentración. Después se calculó el **coeficiente de variación** de cada grupo, el valor de éste debe ser inferior al 15%.





### 3.2.2.5 Exactitud:

A partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad se evaluó la exactitud del método. Para ello, se tomaron los valores de concentración recuperada promedio de los tres niveles de concentración (50, 400 y 750 ng/mL) de ambos parámetros y se verificó que los valores de concentración se encuentran dentro de un rango de  $\pm 15\%$  del valor nominal de la concentración. Para ello se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Desviación Absoluta} = \left[ \frac{\text{Concentración Nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración Nominal}} \right] (100\%)$$

### 3.2.2.6 Estabilidad:

Para asegurar la estabilidad del compuesto en las muestras de voluntarios durante el estudio, se determinaron las condiciones más adecuadas de temperatura y tiempo, tanto en almacenamiento como del procesamiento en las que pueden encontrarse estables las muestras. Para ello se empleó la *tabla 7* de muestreo:

*Tabla 7 Protocolo de muestreo para determinar estabilidad en muestras de voluntarios.*

Muestras procesada	25	0 horas	30 horas	53 horas	103 horas
Ciclo congelación-descongelación	de -70 a 25	0 días	21 días		

Se preparó en un mismo día ( $t_0$ ) por duplicado una solución de azitromicina (5  $\mu\text{g/mL}$ ); a partir de cada solución se elaboraron tres muestras en plasma para cada variante



de estabilidad, de acuerdo a la *Tabla 7*, con las siguientes concentraciones: 50, 400 y 750 ng/mL. El volumen de éstas muestras fue congruente con el número de muestreos a realizar en cada variante.

Se almacenó cada grupo de muestras según la variante y se realizó el muestreo según lo indica la *Tabla 7*. Solo en el caso de las muestras para "Estabilidad de muestra procesada", se almacenó el producto de la extracción y no la muestra plasmática. Se aplicó el proceso de extracción seleccionado conforme se realizó el muestreo y las muestras se inyectaron en CLAR para su análisis. Además de las muestras se corrió una curva de calibración en cada uno de los tiempos de muestreo establecidos.

Se obtuvieron los datos de concentración recuperada para cada una de las muestras y se determinó la **desviación absoluta** con respecto al valor inicial de la muestra  $t_{(0)}$ , el valor de ésta variable debe permanecer inferior al 15% en cada variante del estudio de estabilidad.

#### 3.2.2.7 Límite de cuantificación:

Para realizar el análisis de éste rubro, se preparó por quintuplicado una **solución de azitromicina (5  $\mu\text{g/mL}$ )**; a partir de cada solución se elaboraron muestras con la concentración más baja del rango: 20 ng/mL en plasma.

A partir de los resultados obtenidos se determinó si el valor promedio de las muestras se encuentra dentro del  $\pm 20\%$  de la concentración nominal, para ello se empleó la **desviación absoluta**.



### **3.2.2.8 Límite de Detección:**

A partir de una **solución de azitromicina (5 µg/mL)**; se elaboraron muestras en plasma cuya concentración partió desde el valor más bajo del rango: 20 ng/mL, hasta valores inferiores al rango: 10 ng/mL y 5 ng/mL.

Se observaron los cromatogramas correspondientes, el límite de detección fue la concentración mínima de azitromicina que pudo distinguirse 3 veces por encima del nivel ruido.

### **3.2.2.9. Selectividad:**

Se prepararon muestras individuales en plasma de fármacos de uso común como Ácido salicílico, Acetaminofén, Naproxén, Ranitidina y Heparina a partir de un conjunto de soluciones stock, según la concentración indicada en la *Tabla 8*. Además de lo anterior, se corrieron: (a) una muestra blanco de plasma con E.I., (b) una muestra de voluntario sano (2 hrs. después de la administración) con E.I. y (c) una muestra de prueba (plasma y azitromicina) con E.I. El plasma empleado para elaborar las muestras con fármaco de prueba y la muestra (a) se obtuvieron de cuando menos de seis voluntarios.



**Tabla 8 Fármacos de prueba empleados en la demostración de selectividad del método.**

Ácido salicílico	1000 µg/mL	75	150 µg/mL
Naproxén	1000 µg/mL	25	50 µg/mL
Heparina	1000 ng/mL	100	200 ng/mL

Posteriormente, se aplicó el proceso de extracción seleccionado a todas las muestras y se inyectaron éstas muestras en CLAR para su análisis.

Se obtuvieron los cromatogramas de cada una de las muestras, y se buscó que la respuesta de los fármacos de prueba no interfirieran con la respuesta de **azitromicina** ni con la respuesta del E.I. (14)

### **3.3 Diseño del estudio clínico en voluntarios mexicanos saludables.**

#### **3.3.1. Tipo de estudio:**

Se aplicó un **diseño paralelo** con dos grupos de 12 voluntarios cada uno (un grupo de hombres y un grupo de mujeres) y se administró a un mismo tiempo una dosis única de 500mg de Azitromicina por vía oral en condiciones de ayuno. El lugar para realizar el estudio contaba con servicios médicos adecuados que pudieran intervenir en caso de riesgo, según



lo establece el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Título 2º, Capítulo 1, Art. 19).(15) El producto evaluado se describe en la *tabla 9*.

*Tabla 9 Descripción del medicamento.*

Laboratorio: Pfizer
No. de Lote: 01864031 C

Tomando en cuenta que el  $t_{1/2}$  para azitromicina corresponde a 22 hrs., se tomaron las muestras sanguíneas a tiempos de: 0 (predosis), 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, 48 y 72 horas.

El estudio se realizó contando con el dictamen favorable de las comisiones de investigación, ética y seguridad.

### **3.3.2. Elección de voluntarios para el estudio clínico:**

Los voluntarios que participaron en el estudio clínico para evaluar la biodisponibilidad de azitromicina en población mexicana, fueron elegidos según los criterios de inclusión y exclusión que a continuación se presentan.

#### **Criterios de Inclusión:**

- Se Incluyeron en el estudio solo voluntarios mexicanos del género femenino y masculino con una edad de 20 a 40 años y un índice corporal comprendido entre 19 a



30 Kg/m<sup>2</sup> para voluntarios de género masculino y 18.5 a 29 Kg/m<sup>2</sup> en voluntarios del género femenino.

- Ⓒ Los voluntarios de ambos géneros se encontraban clínicamente sanos; ello se sustentó con pruebas de gabinete (examen físico y electrocardiograma), pruebas de laboratorio (química sanguínea, biometría hemática, examen general de orina, VDRL, detección de virus de hepatitis y VIH), detección de drogas de abuso (ABUSING) y prueba de embarazo.
- Ⓒ Los voluntarios no ingirieron medicamento alguno al menos dos semanas previas al estudio y durante el mismo. Dichos voluntarios tampoco pudieron consumir alcohol, café, tabaco o bebidas de cola por lo menos 48 horas antes de estudio y durante el mismo.

#### ***Criterios de Exclusión:***

- Ⓒ Se eliminó del estudio a todo aquel voluntario que no cumpliera con los criterios de inclusión propuestos.
- Ⓒ No se aceptaron sujetos con sensibilidad o alergia a azitromicina.
- Ⓒ No se incluyeron a voluntarios que presenten signos vitales alterados.
- Ⓒ No se consideraron a aquellos voluntarios con trastornos gastrointestinales, hipertensión arterial e insuficiencia renal o hepática.



- Ⓒ No se incluyeron a aquellos voluntarios que presentan antecedentes de drogadicción o de abuso de fármacos.
- Ⓒ No se incluyeron en el estudio a las mujeres que presentan positiva la prueba de embarazo.
- Ⓒ Se excluyeron del estudio a los voluntarios que presentan un padecimiento médico actual o pasado que pudiera alterar el comportamiento farmacocinético y/o farmacodinámico de Azitromicina.

Una vez elegidos los voluntarios, éstos fueron informados sobre los objetivos, los procedimientos y los riesgos que presenta el estudio. Posteriormente se obtuvo el consentimiento por escrito de cada uno de los voluntarios que desearon participar en el estudio de biodisponibilidad de azitromicina en población mexicana. Las actividades anteriores se realizaron según lo indica el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación (Título 2°, Capítulo 1, Artículos 20, 21 y 22)

### **3.3.3 Procedimiento:**

Posterior a un ayuno de 12 horas, se administró a los voluntarios, por vía oral una tableta de 500 mg de **azitromicina** junto con 250 mL de agua. Se tomaron muestras sanguíneas por medio de un catéter localizado en el brazo, se obtuvieron muestras de 10 mL en tubos "Vacutainer" con heparina como anticoagulante a tiempos de: 0 (pre-dosis), 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, 48 y 72 horas. Posterior a la toma de muestra se registraron los signos vitales de los voluntarios. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. y se separó el plasma en tubos limpios para después almacenarlos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.



### **3.4) Procedimiento para el análisis de las muestras y criterios de control durante el análisis.**

Se analizaron todas las muestras de cada tres voluntarios por corrida. Por cada corrida se cuantificó una **curva de muestras estándar (plasma y azitromicina)** con E.I. Las concentraciones a emplear de azitromicina para ésta curva son de: 20, 30, 75, 100, 200, 500 y 1000 ng/mL. Se aseguró que el proceso de cuantificación fuera consistente a lo largo del estudio, para ello se elaboraron **muestras control (plasma y azitromicina)** con E.I. Se emplearon concentraciones de azitromicina de: 50, 400 y 750 ng/mL. Se elaboraron éstas muestras según lo indica la *Tabla 6 y 7* que presentan la preparación de muestras (plasma y azitromicina) con E.I. Se analizó una serie de muestras control por voluntario, para ello se colocó una muestra control por cada 9 muestras de voluntario. Se cuantificó azitromicina y E.I. por medio del integrador computacional Millennium de Waters S.A.

Se ajustó la relación de alturas ("y") y las concentraciones de las muestras estándar ("x") por medio de un análisis de regresión lineal con mínimos cuadrados, a la ecuación  $y = b + mx$ , donde "b" es la ordenada al origen (intercepto-y), y "m" es la pendiente de la curva de calibración. A partir de cada curva de calibración, se obtuvieron las concentraciones recuperadas para cada una de las muestras de voluntario en la corrida.

#### **3.4.1 Criterios de Validez de la Corrida:**

Se determinó la validez de cada corrida durante el procesamiento de las muestras al examinar la linealidad de la curva patrón y la concentración recuperada en muestras de control de calidad. Se aceptó una corrida sí:





- 1) La curva de calibración contiene al menos 5 valores de concentraciones estándar (de cada 7 utilizados), cuyos valores se encuentren dentro del límite del  $\pm 15\%$  con respecto a su valor nominal y el valor del coeficiente de correlación " $r$ " es  $\geq 0.99$ .
- 2) Si al menos el 65% de los valores de las muestras control se encuentran dentro del límite  $\pm 20\%$  de los valores esperados
- 3) Si más del 75% del total de muestras analizadas en la corrida presentaron un coileo en los picos cromatográficos de interés menor a 2 (calculado con el integrador Millennium de Waters con el método USP) Repetir el análisis de aquellas muestras que no cumplan con dicho criterio.

#### **3.4.2. Criterios de Selección de datos en caso de Repetición:**

En el caso de repetir el análisis de una muestra, los criterios para saber que concentración utilizar en los cálculos finales, en orden de aplicación, fueron los siguientes:

1. Si el valor de la repetición se encuentra dentro del  $\pm 15\%$  del valor original, el valor original es utilizado en los cálculos finales.
2. Si el valor de la repetición es mayor que  $\pm 15\%$  del valor original, el análisis de la muestra es repetido otra vez. La formula utilizada para calcular esto es:



$$\text{Diferencia\%} = \frac{|Original - \text{Re petición 1}|}{\text{Promedio}(Original + \text{Re petición 1})} \times 100$$

3. Si los valores de las segundas repeticiones están dentro del  $\pm 15\%$  del valor original, el valor original es usado en los cálculos finales.

$$\text{Diferencia\%} = \frac{|Original - \text{Re petición 2}|}{\text{Promedio}(Original + \text{Re petición 2})} \times 100$$

4. Si los valores de las primeras y segundas repeticiones son mayores que  $\pm 15\%$  del valor original, pero la diferencia % (ver formula abajo) entre las dos repeticiones no es mayor que  $\pm 15\%$ , entonces se utiliza el valor promedio de las repeticiones para los cálculos finales.

$$\text{Diferencia\%} = \frac{|\text{Re petición 1} - \text{Re petición 2}|}{\text{Promedio}(\text{Re petición 1} + \text{Re petición 2})} \times 100$$

5. Si la diferencia % de las repeticiones señaladas en el punto anterior es mayor que  $\pm 15\%$ , entonces el promedio del valor original, el valor de la repetición 1 y el valor de la repetición 2, es usado para los cálculos finales.
6. El valor original es usado si no existe plasma suficiente para efectuar el re-análisis.

No se incluyeron en los cálculos las concentraciones de las muestras por debajo del límite de cuantificación (tomando en cuenta la variabilidad máxima permitida del  $\pm 20\%$ ).



### 3.5) Cálculo de los parámetros farmacocinéticos de azitromicina en población mexicana.

A partir de los registros de cuantificación de muestras, se obtuvo el perfil farmacocinético de cada uno de los voluntarios al graficar: concentración de azitromicina (ng/mL) contra tiempo (hrs). Posteriormente se determinó el siguiente conjunto de parámetros farmacocinéticos:

- ⓐ Determinar el área bajo la curva de concentración plasmática en el perfil farmacocinético, desde la administración hasta el último tiempo "t" ( $ABC_{0-t}$ ), para ello puede emplear el **método trapezoidal**.
  
- ⓑ Calcular el área bajo la curva de concentración plasmática extrapolada desde el tiempo "t" a infinito ( $ABC_{t-\infty}$ ), al dividir la última concentración plasmática entre la **pendiente terminal** ( $\beta$ ).
  
- ⓒ Calcular el área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración (tiempo cero) a infinito ( $ABC_{0-\infty}$ ) al sumar el  $ABC_{0-t}$  y el  $ABC_{t-\infty}$ .
  
- ⓓ Identificar la concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) a partir del perfil farmacocinético.



- Ⓒ Identificar el tiempo al cual se alcanza la concentración plasmática máxima ( $T_{max}$ ) a partir del perfil farmacocinético.
- Ⓒ Calcular los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $k_a$  por medio del método de las residuales.
- Ⓒ Calcular la vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ) como  $0.936 / \beta$ .
- Ⓒ Calcular  $CL / F$  como  $Dosis / ABC_{0 \rightarrow \infty}$ .
- Ⓒ Calcular  $V_d / F$  como  $Dosis / (ABC_{0 \rightarrow \infty} \times \beta)$ .

Se construyeron los perfiles farmacocinéticos con ayuda del software Microsoft Excel versión 2000 y calcular los parámetros farmacocinéticos con el software Biopak® versión 2.0.

### 3.6 Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos

Se determinó si existe una diferencia entre los datos del género masculino y los datos de género femenino. Para ello se identificó el tipo de distribución que presentan los datos farmacocinéticos de ambos géneros con la "Prueba de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov" y la "Prueba de Igualdad de Varianzas de Levene". A continuación se aplicó una "Prueba t de student" sobre aquellos datos cuya distribución fuera normal y una "Prueba de Mann Whitney" en los datos cuya distribución no fuera normal. Para realizar cada una de éstas pruebas estadísticas, se empleó el software Sigma Stat ®.



*CAPITULO IV*

*RESULTADOS Y  
ANÁLISIS DE  
RESULTADOS*



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .

El presente capítulo tiene por finalidad realizar la exposición de los resultados y el análisis de los mismos. Así pues, el siguiente capítulo comprende las siguientes secciones:

- 4.1 Resultados del desarrollo del método analítico para cuantificar azitromicina de muestras plasmáticas por medio de CLAR.
- 4.2 Resultados de la validación del método analítico para cuantificar azitromicina de muestras plasmáticas por medio de CLAR.
- 4.3 Análisis de las muestras obtenidas para el **ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE AZITROMICINA EN POBLACIÓN MEXICANA.**
- 4.4 Obtención de parámetros farmacocinéticos de azitromicina, en voluntarios mexicanos.
- 4.5 Evaluación de los parámetros farmacocinéticos obtenidos, respecto a otras poblaciones diferentes a la mexicana.

#### **4.1 Resultados del desarrollo del método analítico para cuantificar azitromicina de muestras plasmáticas por medio de CLAR.**

##### **4.1.1. Condiciones cromatográficas del método analítico:**

Después de evaluar varias condiciones cromatográficas, se determinó un conjunto de resultados, mismos que se exponen en la *Tabla 10*. A partir de éstas condiciones de trabajo, se obtuvieron tiempos de retención para azitromicina y claritromicina (E.I.) de 4.4 min. y 6.0



min. respectivamente. El tiempo de corrida se consideró de 9 min. tiempo suficiente para registrar las respuestas de azitromicina y claritromicina. Mientras que la resolución entre los picos de interés fue mayor a 1.5 y la constante de capacidad ( $k'$ ) se mantuvo dentro del rango  $2 < k' < 10$ , con valores de 2.14 para azitromicina y 3.28 para claritromicina. Por otra parte la simetría para los picos de azitromicina y claritromicina fue menor a 2 con éstas condiciones.

**Tabla 10 Condiciones Cromatográficas finales.**

Tipo de detector	Detector electroquímico DECADE-Waters
Tipo de columna	Columna para cromatografía en fase reversa C18 (X-Terra RP18 (250 x 4.6 mm) 5 $\mu$ m.
Fase móvil	Mezcla 40:60 v/v acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico anhidro (0.05 M y pH 7.2)
Estándar interno	Claritromicina

Con las condiciones cromatográficas anteriores fue posible realizar el análisis de las muestras para las diferentes técnicas de extracción ensayadas. Así mismo, la eficiencia de cada técnica de extracción se relacionó directamente con la cantidad recuperada de azitromicina y E.I. y la ausencia de impurezas que pudieran interferir en la respuesta de ambos compuestos.

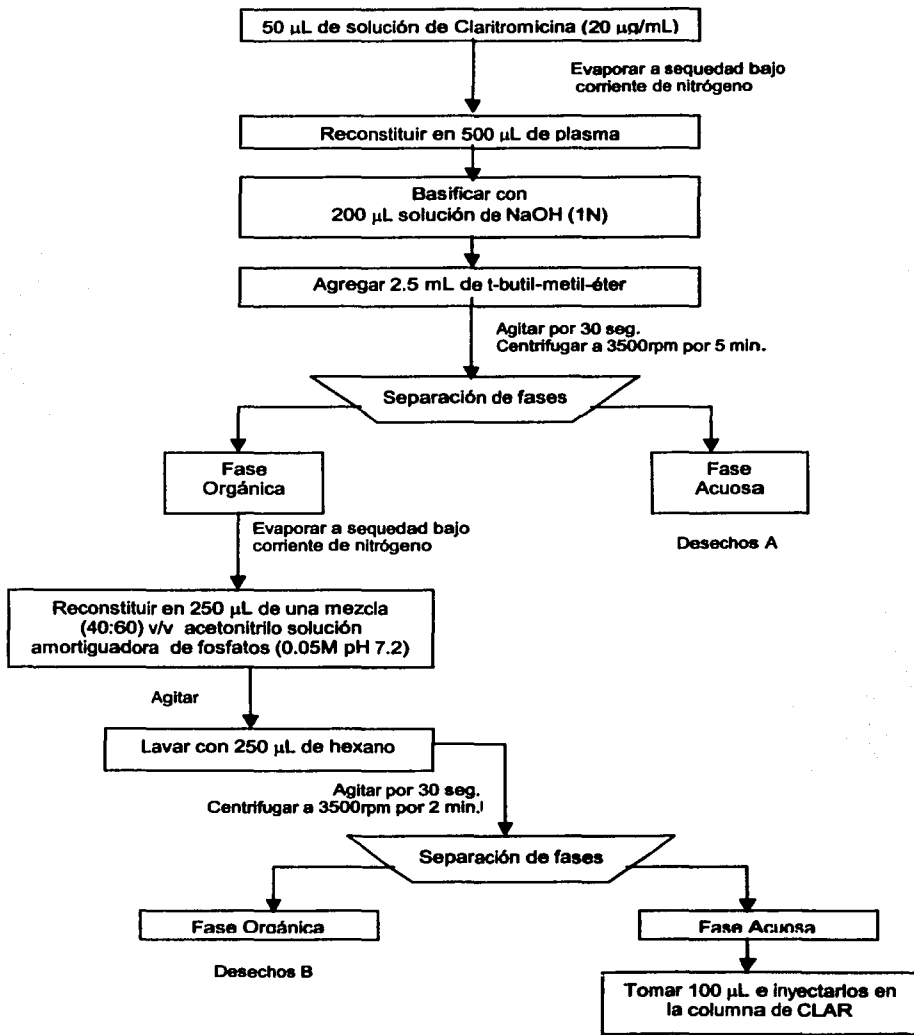


Figura 5. Técnica analítica para la extracción de azitromicina de muestras plasmáticas.





La técnica de extracción presentada en la *Figura 5* presenta la mayor eficiencia, ya que se eliminaron totalmente las impurezas y se obtuvo una buena cantidad recuperada tanto de azitromicina como del E.I.

Los desechos generados al emplear ésta técnica de extracción se colectaron en recipientes limpios etiquetados como: desechos tipo A y desechos tipo B. Posteriormente se enviaron al edificio A de la Facultad de Química para su tratamiento y disposición final.

#### **4.2 Resultados de la validación del método analítico para cuantificar azitromicina de muestras plasmáticas por medio de CLAR.**

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, los parámetros evaluados en la validación del método analítico para cuantificar azitromicina en muestras plasmáticas por medio de CLAR, se obtuvieron principalmente de la NOM-177 SSA1 1998, misma que incluye los valores de respuesta para determinar el cumplimiento de cada parámetro. A continuación se realizará una exposición de los resultados obtenidos para cada rubro evaluado.

##### **4.2.0 Adecuabilidad del Sistema:**

A continuación se presenta el registro (*Tabla 11*) hecho a partir de la adecuabilidad del sistema al inicio de corrida. Observar la reproducibilidad del tiempo de retención, el factor de capacidad ( $\alpha$ ) y la respuesta a lo largo de 5 inyecciones continuas. En ésta serie de valores se puede observar que el CV% permanece inferior al 2%. Por otra parte los valores



para resolución se mantuvieron en todos los casos mayores a 1.5; de la misma forma los valores para simetría fueron inferiores a 2 en todos los casos.

**Tabla 11. Adecuabilidad del sistema.**

1	4.422	6.099	2.159	3.356	0.542
3	4.428	6.004	2.163	3.289	0.541
5	4.411	6.09	2.151	3.350	0.535
Desviación E.	0.006	0.041	0.005	0.029	0.004

Éste es tan solo uno de los registros hechos durante el proceso de validación y posteriormente a lo largo del proceso de cuantificación de azitromicina en las muestras plasmáticas. Al igual que en éste, los demás registros cumplen con los límites de repetibilidad, por lo que podemos asegurar que el equipo trabajó en óptimas condiciones a lo largo el estudio.

#### **4.2.1 Resultados de la Validación del Sistema:**

##### **4.2.1.1 Linealidad:**

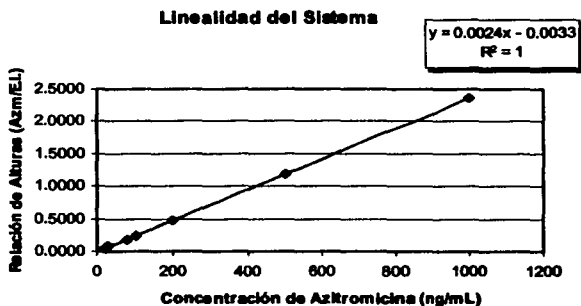
La **Tabla 12** presenta los resultados obtenidos al evaluar la linealidad del sistema. Es importante apreciar que en la gráfica: relación de alturas versus concentración nominal de azitromicina, se encontró un coeficiente de correlación mayor al 0.99 y un error debido a la regresión (EDAR%) menor al 2% para ambas curvas.



**Tabla 12. Linealidad del sistema.**

20	0.0473	0.0467
75	0.1761	0.1761
200	0.4836	0.4852
1000	2.3651	2.3666
Ordenada	-0.0030	-0.0035
Sy/x	0.0037	0.0034

Con ésta evidencia se concluye que el sistema es lineal dentro del intervalo de trabajo, que va desde 20 ng/mL hasta 1000 ng/mL. Esto se puede apreciar de forma aún mas clara al observar la *Figura 6*.



**Figura 6. Linealidad del Sistema (Promedio)**



#### 4.2.1.2 Precisión:

Este rubro se analizó a partir de los resultados obtenidos en la linealidad del sistema. Para ello se determinó el F.R. de cada respuesta (*ver tabla 13*) y posteriormente se obtuvo el CV% de todos los F.R. el cual fue de 0.98%. Según lo anterior podemos señalar que el sistema es preciso.

*Tabla 13. Precisión del Sistema.*

20	0.0473	0.00237	0.0467	0.00234
75	0.1761	0.00235	0.1761	0.00235
200	0.4636	0.00232	0.4652	0.00233
1000	2.3651	0.00237	2.3666	0.00237

#### 4.2.2 Resultados para la Validación de Método:

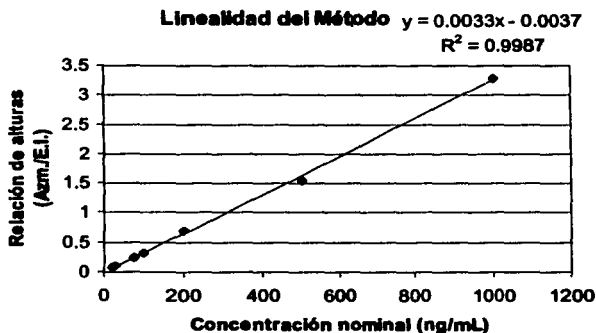
##### 4.2.2.1 Linealidad:

La *Tabla 14* muestra los resultados obtenidos al evaluar la linealidad del método a través de la relación de alturas versus concentración nominal; se observa que para cada una de las tres curvas, el valor del coeficiente de regresión es mayor al 0.99.

**Tabla 14. Linealidad del método.**

20	0.0661	0.0603	0.0868	0.0711
75	0.2152	0.2350	0.2760	0.2421
200	0.6506	0.7308	0.7056	0.6957
1000	3.0224	3.5302	3.3228	3.2918
Pendiente	0.0030	0.0035	0.0033	0.0033

A partir de ésta tabla se obtuvo la información suficiente para concluir que el método analítico es lineal dentro del intervalo de trabajo. Esto se ve reflejado de forma aún más clara en la *Figura 7* que se muestra a continuación.



**Figura 7. Linealidad del Método (Promedio)**



#### 4.2.2.2 *Recuperación Absoluta:*

La *Tabla 15* presenta los datos obtenidos en la evaluación de la recuperación absoluta. Se observa que el porcentaje promedio obtenido es 91.91%, razón que se conserva dentro del intervalo de trabajo.

*Tabla 15. Recobro Absoluto.*

	1	147305	124209
	2	136024	113306
	3	140833	137089
	1	77953	75732
	2	77790	67540
	3	75479	67389
	1	9072	8348
	2	8878	8920
	3	9229	8911

#### 4.2.2.3 *Precisión – Repetibilidad:*

Para evaluar la repetibilidad del método analítico se determinó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración analizado. Es necesario decir que la serie de muestras evaluadas para este rubro se corrieron en un mismo día. Como se puede observar en la *Tabla 16* el coeficiente de variación se mantuvo inferior al 15% en todos los casos, por ello podemos decir que el método cumple con el parámetro repetibilidad.



**Tabla 16 Repetibilidad del método analítico.**

Muestra 1	44.52	392.90	723.69
Muestra 3	51.54	386.91	696.46
Muestra 5	61.44	423.88	765.60
Promedio	51.99	401.60	738.43
Coefficiente de Variación (%)	12.14	4.68	3.80

**4.2.2.4 Precisión - Reproducibilidad :**

Por otra parte, las muestras empleadas para evaluar la reproducibilidad del método, se corrieron durante tres días consecutivos, una vez obtenidos los resultados se determinó el coeficiente de variación. La *Tabla 17* muestra los resultados de dicha evaluación.

**Tabla 17 Reproducibilidad del método analítico.**

Nº de Muestra				
1	1	48.69	412.19	753.71
2	1	53.79	402.23	736.28
3	1	43.44	387.85	712.48
Promedio		48.10	389.67	725.31
CV%		8.60	4.01	2.80



Como se puede ver en ésta tabla los valores que toma el coeficiente de variación para cada nivel de concentración son menores al 15%. A partir de éstos resultados podemos concluir que el método es reproducible.

#### 4.2.2.5 Exactitud:

A continuación se presenta la *Tabla 18* en la que se pueden observar los coeficientes de variación promedio por nivel de concentración, obtenidos en los rubros de repetibilidad y reproducibilidad del método. Partiendo de dichos resultados se obtuvo el porcentaje de desviación absoluta.

*Tabla 18 Exactitud del Método.*

50	51.99	3.97
750	738.43	1.54
50	48.10	3.80
750	725.31	3.29

Como se puede ver, la desviación absoluta para cada nivel de concentración se mantiene por debajo del 15% del valor nominal, es decir que el método analítico es exacto.





#### 4.2.2.6 Estabilidad:

En las *Tablas 19, 20, 21, 22 y 23* se muestran los resultados obtenidos a partir de las pruebas de estabilidad de acuerdo a lo establecido en el protocolo de trabajo.

La *Tabla 19* indica la estabilidad de la muestra procesada a una temperatura ambiente. Si observamos los valores que toma el porcentaje de desviación absoluta conforme pasa el tiempo, podremos advertir que la muestra procesada se mantuvo estable, ya que en ningún caso la desviación absoluta excede el 15%.

*Tabla 19 Estabilidad de muestra procesada.*

	49.24	368.71	569.30
	48.01	381.65	553.54
	47.28	342.62	534.26
	43.38	362.91	517.39
	44.85	343.54	530.42
	40.84	357.83	514.69
	51.60	414.03	599.72
	48.75	402.16	596.04

La *Tabla 20* presenta los resultados obtenidos para la estabilidad de las muestras sin procesar a temperatura ambiente, como se puede apreciar la estabilidad de la muestra se



demostró hasta las 48 horas, pero aún cuando los resultados en la tabla se mantienen por debajo del 15% de desviación absoluta, se puede ver que no es aconsejable exponer las muestras sin procesar por tanto tiempo a temperatura ambiente.

*Tabla 20. Estabilidad a temperatura ambiente.*

	53.20	386.05	708.42
	49.00	388.09	855.01
	51.75	453.16	775.63
	53.39	437.03	849.29
	58.93	427.70	748.89
	54.23	436.35	792.86

En la *Tabla 21* se puede ver que al menos después de dos ciclos de congelación descongelación (desde  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta temperatura ambiente) la muestra se conservó estable, ya que el porcentaje de desviación absoluta se mantuvo muy por debajo del 15%, por lo cual es aconsejable procurar la congelación de las muestras, pero no se debe exceder de más de dos ciclos de congelación descongelación, ya que la estabilidad de un tercer ciclo se desconoce.



**Tabla 21. Estabilidad del ciclo congelación – descongelación.**

	53.20	388.05	708.42
	49.00	388.09	855.01
	51.80	410.87	768.66
	51.51	409.83	894.61

La **Tabla 22** presenta los resultados obtenidos para la estabilidad de la muestra sin procesar a una temperatura de almacenamiento de refrigeración (4°C). Como se puede ver la estabilidad de las muestras se puede asegurar en la mayoría de los casos hasta después de 9 días, sin embargo al día 21 de almacenamiento los valores de desviación absoluta traspasan el límite del 15%.

**Tabla 22 Estabilidad de la muestra refrigerada.**

	53.20	388.05	708.42
	49.00	388.09	855.01
	55.86	464.08	821.22
	52.79	422.30	862.24
	60.67	464.08	817.08
	58.27	445.60	932.21



En la *Tabla 23* se hace un **resumen de las pruebas de estabilidad** para las muestras procesadas y sin procesar; a partir de esta tabla podemos decir que conocemos las condiciones de tiempo y temperatura bajo las cuales el método asegura la integridad de la muestra.

*Tabla 23 Resumen de las pruebas de estabilidad.*

Estabilidad de la muestra procesada	103 horas	3.19	8.77	6.49
Estabilidad de congelación descongelación	21 días	0.01	0.06	0.06

#### 4.2.2.7 Límite de cuantificación:

La concentración probada como límite de cuantificación fue 20ng/mL, una vez obtenida la respuesta, se obtuvieron los correspondientes valores de concentración interpolada. Como podemos observar en la *Tabla 24*, el porcentaje de desviación absoluta se mantiene por debajo del 20%, ello indica que la concentración de 20ng/mL puede ser empleada confiablemente como límite de cuantificación .



**Tabla 24. Límite de cuantificación.**

20A	0.0861	23.46
20C	0.0868	22.90
20E	0.0522	16.02
Desviación E.		3.23
% DESV. ABS		8.61

**4.2.2.8 Límite de detección:**

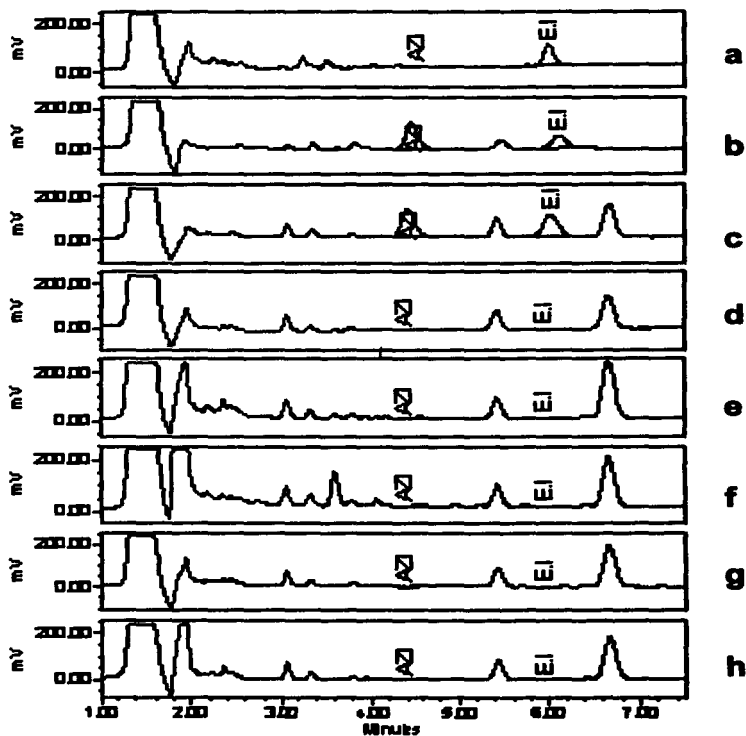
La concentración determinada como límite de detección se registró en 10ng/mL, concentración que puede ser distinguida del ruido, pero que no presenta precisión al ser cuantificada. Para realizar esta determinación se empleó el software Millenium Waters.

**4.2.2.9 Selectividad:**

Después de realizar el análisis de los cromatogramas correspondientes a los fármacos de prueba no se observaron picos de otras respuestas que pudieran interferir con la determinación de azitromicina o el E.I. Al tomar en cuenta la observación anterior podemos decir que el método es selectivo y no presenta interferencia por parte de los fármacos de prueba. (Figura 8)



Figura 8. Cromatogramas de evidencia para la demostración de selectividad del método analítico.



Nota: (a) una muestra blanco de plasma con E.I., (b) una muestra de voluntario sano (2 hrs. después de la administración) con E.I.; (c) una muestra de prueba (plasma y azitromicina) con E.I. (d) Muestra de prueba (plasma y ranitidina) (e) Muestra de prueba (plasma y heparina) (f) Muestra de prueba (plasma y paracetamol) (g) Muestra de prueba (plasma y natroxiene) (h) Muestra de prueba (plasma y ácido acetil salicílico).



### 4.3 Análisis de las muestras obtenidas para el ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE AZITROMICINA EN POBLACIÓN MEXICANA.

El estudio clínico se realizó en la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital Español y como lo marca el protocolo de trabajo, las muestras se obtuvieron de voluntarios mexicanos en estado de salud, que cumplieron los criterios de inclusión.

Uno de dichos criterios es el Índice de Masa Corporal (IMC) comprendido entre 19 a 30 Kg/m<sup>2</sup> para voluntarios de género masculino y 18.5 a 29 Kg/m<sup>2</sup> en voluntarios del género femenino. La *Tabla 27* presenta el registro de IMC de los voluntarios que participaron en el estudio. Como se puede observar todos los voluntarios que participaron cumplieron con los rangos de IMC permitidos.

*Tabla 25. Relación de peso, talla e IMC de los voluntarios.*

1	76	186	21.97	13	58	165	21.30
3	93.50	178	29.51	15	57.00	174	18.83
5	66.00	167	23.67	17	69.50	167	24.92
7	63.00	172	21.30	19	53.00	163	19.95
9	65.50	169	22.93	21	51.50	159	20.37
11	62.00	174	20.48	23	59.00	166	21.41

Siguiendo el protocolo de trabajo, se tomaron las muestras sanguíneas a tiempos de: 0 (predosis), 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, 48 y 72 horas. Una vez obtenidas las muestras se



trasladaron al laboratorio de la Farmacocinética de la Torre de Investigación, en la Facultad de Medicina de la UNAM, donde se realizó el análisis de las muestra por medio de una técnica previamente desarrollada y validada para cuantificar azitromicina por medio de CLAR.

Como se señaló en el procedimiento de análisis de las muestras, antes de cada corrida se realizó la cuantificación de una curva patrón (Tabla 26). Posteriormente se obtuvo la ordenada de origen, la pendiente y el coeficiente de regresión "r" (Tabla 27), para la curva: concentración nominal contra respuesta. El objetivo de ésta curva de muestras control, es identificar la cantidad recuperada de azitromicina en las muestras de voluntarios, por medio de interpolación.

Tabla 26. Curvas de muestras control.

1, 2 y 3	16.72	31.09	72.67	98.49	208.22	501.40	988.42
7, 8 y 9	16.38	28.52	67.54	110.31	202.62	504.89	988.74
13, 14 y 15	18.92	30.36	74.56	95.23	199.12	512.22	994.59
19, 20 y 21	23.56	31.91	78.60	103.18	208.63	486.49	1014.42
Repeticiones	*	27.77	75.64	101.79	205.63	490.91	1003.28
Desviación Estándar	3.51	2.11	4.94	4.91	3.99	16.10	7.31
Desviación Absoluta	2.2375	0.6593	0.9437	0.5800	1.1294	0.9809	0.1854





**Tabla 27. Ecuaciones de las curvas de muestras control.**

1, 2 y 3	0.0005	1.0000	1.0000
7, 8 y 9	-0.0013	1.0000	0.9999
13, 14 y 15	-0.0011	1.0000	0.9999
19, 20 y 21	-0.0015	1.0000	0.9991
Repeticiones	-0.0005	1.0000	0.9999

Para asegurar que el proceso de cuantificación fuera consistente a lo largo del estudio, se introdujeron muestras control, una por cada 9 muestras de voluntario. El resultado obtenido de los controles se muestra en la *tabla 28*.



**Tabla 28 Muestras control analizadas a lo largo del estudio.**

4, 5 y 6	738.6	389.19	51.43
	744.8	409.92	56.28
	806.65	420.64	47.07
10, 11 y 12	736.53	351.06	54.38
	737.54	336.47	52.97
	718.36	364.25	47.25
16, 17 y 18	786.82	388.41	43.04
	731.7	392.51	42.6
	736.73	394.23	45.66
22, 23 y 24	873.06	473.4	51.35
	787.29	457.34	48.9
	-	357.6	57.03

\* Fuera del límite  $\pm$  20%

La **Tabla 29** presenta aquellas muestras que una vez cuantificadas, no cumplieron con los criterios de validez, razón por la cual se realizó nuevamente su análisis, con el fin de eliminar posibles datos erróneos.



Tabla 29. Resumen de las muestras repetidas por incumplimiento en los criterios de validez.

9	2	Valor fuera de la curva	1036.88	935.52	1036.88	1
21	2	Valor fuera de la curva	1723.7	1427.83	1723.7	6
24	2	Valor fuera de la curva	1156.82	930.13	1156.82	6

A partir de los datos crudos mostrados en las tablas A y B del anexo I, se obtuvo la concentración plasmática (Cp) promedio de azitromicina para cada género de la población mexicana y un promedio de ambos para los diferentes tiempos de muestreo (Tabla 30).

Tabla 30 Concentraciones plasmáticas (Cp) de azitromicina por género y promedio.

0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2	473.14 ± 244.17	673.46 ± 524.02	577.66 ± 418.17
4	302.74 ± 119.63	425.31 ± 230.52	364.02 ± 190.20
8	115.43 ± 32.44	177.11 ± 97.94	146.27 ± 78.00
24	57.15 ± 14.55	80.98 ± 39.96	69.06 ± 31.83
72	23.69 ± 3.23	34.51 ± 12.84	29.70 ± 10.90

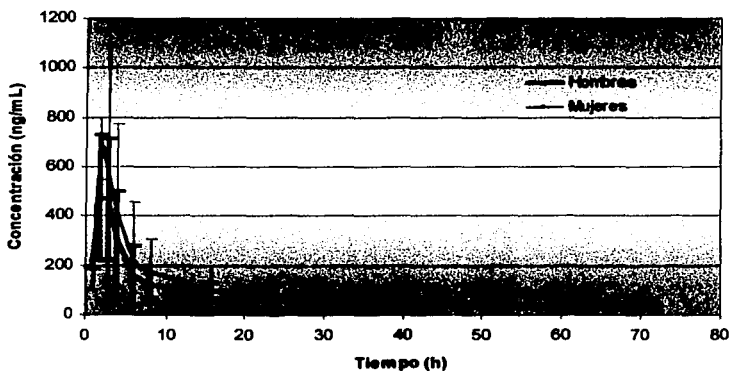
Nota: las concentraciones plasmáticas registradas a 72h tanto en hombres como en mujeres poseen respectivamente valores de 4 y 5 para n.

En la tabla 30 podemos observar que a tiempo cero (pre-dosis) no hay presencia de azitromicina. En las primeras cuatro horas posteriores a la administración el valor de Cp aumenta de forma rápida. Para el siguiente tiempo de muestreo se observa una disminución muy lenta del Cp. Otra tendencia indica que el grupo de mujeres muestra una absorción mayor del fármaco.

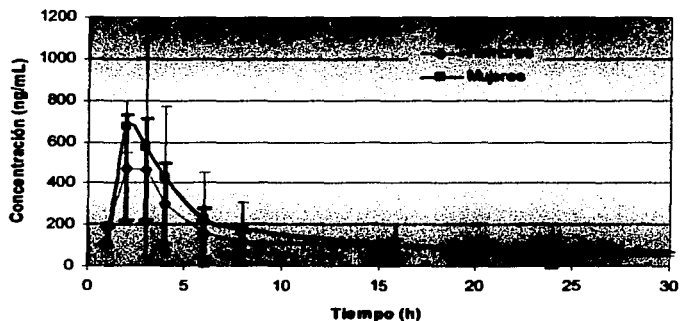


Partiendo de las *tablas A y B del Anexo I* se elaboró el perfil farmacocinético (Cp vs. tiempo) de cada voluntario (*Ver anexo II*), así como el perfil para los valores generales de cada género y los valores de población total (*Figuras 9, 10, 11 y 12*).

**Figura 9. I. Perfil farmacocinético en voluntarios mexicanos sanos (Vía Oral 500mg de AZM) Diferencia del género**

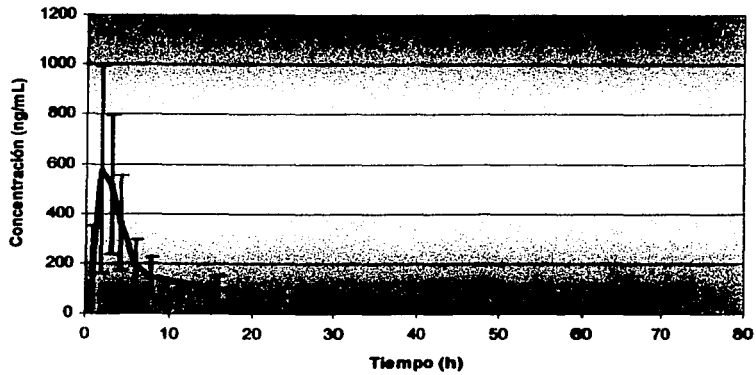


**Figura 10. Ampliación al Perfil farmacocinético de voluntarios mexicanos sanos (Vía Oral 500mg de AZM) Diferencia del género**

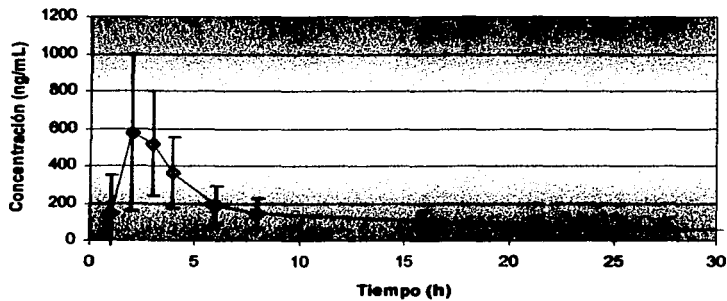




**Figura 11. Perfil farmacocinético en voluntarios mexicanos sanos (Vía Oral 500mg de AZM) Promedio**



**Figura 12. Ampliación al Perfil farmacocinético de voluntarios mexicanos sanos (Vía Oral 500mg de AZM) Promedio**

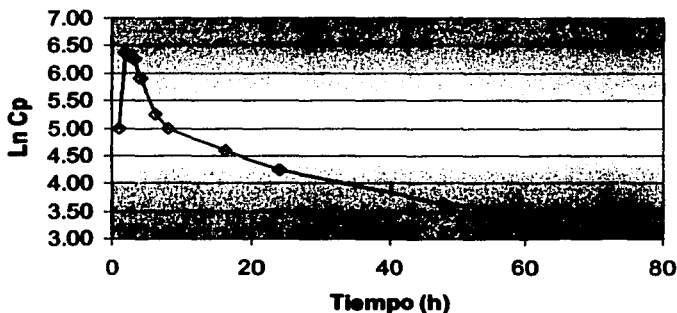




A través de los perfiles farmacocinéticos, anteriores, podemos advertir claramente las tendencias que la *tabla 30* mostraba. Por un lado la comparación de los perfiles farmacocinéticos para ambos géneros presenta una diferencia en la absorción del fármaco, siendo ésta probablemente mayor para las mujeres.

La tendencia de la curva en los perfiles farmacocinéticos y en el gráfico: logaritmo de Cp vs. tiempo mostrado en la *figura 13*, revela una distribución **bicompartmental**, ya que una vez alcanzada la concentración máxima podemos observar un periodo de rápida disminución del fármaco (pendiente mayor) seguido de un periodo de disminución lenta (pendiente menor). Esto podría significar que "Azitromicina" se distribuye primero de forma rápida en un grupo de tejidos, (posiblemente riñón, hígado y otros órganos altamente irrigados), y posteriormente lo hace en un segundo grupo (músculo y tejido adiposo). De tal forma que los perfiles farmacocinéticos estarían reflejando la diferencia entre las velocidades de eliminación de ambos compartimentos.

**Figura 13. Gráfica Ln de Cp vs. tiempo para la Cp promedio de los 24 voluntarios.**





#### 4.4. Obtención de parámetros farmacocinéticos de azitromicina, en voluntarios mexicanos.

El siguiente paso fue obtener aquellos parámetros farmacocinéticos que nos permitieran evaluar la biodisponibilidad de azitromicina en ambos géneros y en la población total. Con éste fin se tomaron los perfiles farmacocinéticos (*Anexo II*) de cada voluntario, así como los valores registrados en las *tablas A y B del Anexo I* para determinar:  $ABC_{0-t}$ ,  $ABC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  y  $t_{1/2}$  según el algoritmo establecido en el protocolo, los resultados se muestran en las *tabla C y D del anexo I*.

Una vez obtenidos los parámetros farmacocinéticos para cada voluntario, se obtuvieron los promedios para ambos géneros y para la población total, los resultados obtenidos se muestran a continuación en la *tabla 31*.

*Tabla 31. Parámetros farmacocinéticos de voluntarios mexicanos sanos a los cuales se les administró una dosis única de 500mg de azitromicina vía oral. (ambos géneros y población total)*

$ABC(0-t)$ mg* $hV_L$	5.1817 $\pm$ 1.8459	6.6052 $\pm$ 3.4561	5.8521 $\pm$ 2.7707
$C_{max}$ (mg/mL)	0.6395 $\pm$ 0.1872	0.8166 $\pm$ 0.5150	0.7242 $\pm$ 0.3625
$t_{1/2}$ (h)	22.8776 $\pm$ 6.6512	20.7777 $\pm$ 6.8804	21.8277 $\pm$ 6.6046



Con la finalidad de identificar posibles diferencias entre los parámetros farmacocinéticos de hombres y mujeres de la población mexicana, se realizó un análisis comparativo por medio de la estadística. Dicho análisis comprendió varios pasos, el primero de ellos fue determinar si los datos obtenidos poseían una distribución normal o no; para ello se empleó una "Prueba de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov" y una "Prueba de Igualdad de Varianzas de Levene". El siguiente paso consistió en aplicar una "Prueba de t" en aquellos valores con distribución normal y una "Prueba de Mann Whitney" en los datos sin distribución normal. Los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 32*.

*Tabla 32. Resultados del análisis estadístico para determinar diferencia en la Biodisponibilidad de Azitromicina para ambos géneros en población mexicana.*

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
n=23	[Redacted]	No
n=24	[Redacted]	No
n=23	[Redacted]	No
n=23	[Redacted]	No
n=23	[Redacted]	No





Como se observa en la *tabla 32*, los parámetros que describen la farmacocinética de azitromicina no presentan una diferencia estadísticamente significativa. Lo anterior revela que en la población mexicana el comportamiento farmacocinético de azitromicina es similar en hombres y mujeres. Es decir, que la cantidad absorbida de azitromicina y la velocidad a la que este fenómeno sucede no son afectadas directamente por el género, esto en el caso de la población mexicana.

En la *Tabla 33* se presentan el resto de los parámetros farmacocinéticos debidos a la distribución bicompartimental que presenta azitromicina.

*Tabla 33 Constantes calculadas para el modelo bicompartimental de azitromicina, después de una administración oral única de 500mg en voluntarios mexicanos sanos.*

$\alpha$ (1/h)	$0.7723 \pm 0.2131$	$0.9096 \pm 0.4497$	$0.8409 \pm 0.3512$
$k_a$ (1/h)*	$2.0487 \pm 1.2229$	$2.2668 \pm 1.1441$	$2.1941 \pm 1.1314$

\* En el calculo de  $k_a$  se empleo  $n=5$  para hombres y  $n=10$  para mujeres.



*CAPITULO V*

*CONCLUSIONES*



## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos, las conclusiones fueron las siguientes:

- ④ Se desarrolló y validó un método analítico para cuantificación de azitromicina de muestras plasmáticas, empleando para ello una extracción líquido – líquido y una técnica por CLAR.
  
- ④ Al comparar los parámetros que describen la farmacocinética de azitromicina en hombres y mujeres de la población mexicana: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; por lo cual se concluye que el género no influye en la farmacocinética de azitromicina en la población mexicana.



*ANEXOS*

**ANEXO I DATOS FARMACOCINÉTICOS**

**Tabla A Concentración de azitromicina en muestras plasmáticas de voluntarios mexicanos sanos a diferentes tiempos. (voluntarios hombres).**

Voluntarios:  
Concentración (ng/mL)

1	45.68	64.32	N.C.	673.42	128.92	N.D.	29.81	662.33	67.32	88.09	97.13	33.16
3	233.08	456.20	875.69	409.69	799.06	459.83	306.32	405.80	377.04	254.49	492.33	519.67
6	130.28	155.56	184.68	116.65	167.32	145.60	127.65	124.94	201.80	76.88	210.86	262.21
16	59.24	204.66	92.78	85.51	72.23	78.28	57.57	66.53	75.84	47.11	56.17	237.07
48	30.36	30.02	29.94	64.20	37.04	28.43	22.94	37.52	28.43	20.36	21.52	23.80

N.D.= No determinada; y N.C.= No cuantificada. Nota: La mayoría de las muestras obtenidas después de las 72 horas de la administración fueron N.C.

**Tabla B Concentración de azitromicina en muestras plasmáticas de voluntarios mexicanos sanos a diferentes tiempos. (voluntarios mujeres).**

Voluntarios:  
Concentración (ng/mL)

1	N.D.	321.51	N.C.	21.83	48.27	23.16	320.05	68.81	21.15	23.58	N.D.	60.66
3	277.34	225.60	536.78	485.79	340.84	155.53	345.70	605.84	626.53	1243.68	962.98	1032.18
6	95.44	96.62	188.53	138.05	153.54	89.02	305.20	227.05	415.72	278.34	211.14	497.16
16	59.43	78.31	95.33	55.86	55.89	39.22	156.99	112.33	127.83	124.09	115.76	213.72
48	20.17	32.83	32.42	27.56	N.C.	N.C.	68.66	38.29	49.76	65.52	39.37	73.56

N.D.= No determinada; y N.C.= No cuantificada. Nota: La mayoría de las muestras obtenidas después de las 72 horas de la administración fueron N.C.



**Tabla C** *Parámetros farmacocinéticos de voluntarios mexicanos sanos a los cuales se les administró una dosis única de 500mg de azitromicina vía oral. ( hombres)*

1	3321.92	4542.34	422.86	2	27.86	110.08
3	5567.3	6282.75	875.69	3	16.56	79.58
5	5439.9	6644.53	799.08	3	24.39	75.25
7	3757.5	4355.45	655.87	2	18.06	114.80
9	5073.68	5784.56	1036.88	2	15.60	86.44
11	3949.85	4548.43	492.33	3	19.28	109.93

**Tabla D** *Parámetros farmacocinéticos de voluntarios mexicanos sanos a los cuales se les administró una dosis única de 500mg de azitromicina vía oral. (mujeres)*

14	4339.42	5299.63	378.51	2	30.22	94.35
16	3514.53	4286.72	485.79	3	23.09	116.64
18	1568.16	1971.56	285.71	2	10.46	253.61
20	7654.77	8611.74	1484.62	2	16.73	58.06
22	9190.15	10563.58	1243.68	3	28.51	47.33
24	13062.89	14799.58	1156.82	2	22.92	33.78

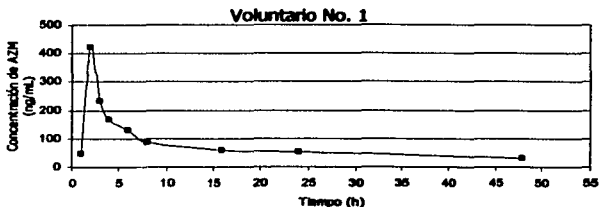


ANEXO III

PERFILES FARMACOCINÉTICOS

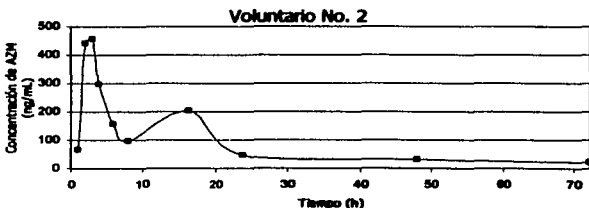
Voluntario No.1

Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	45.68
2	422.86
3	233.08
4	168.46
6	130.26
8	87.53
16	59.24
24	51.95
48	30.36
72	N.C.



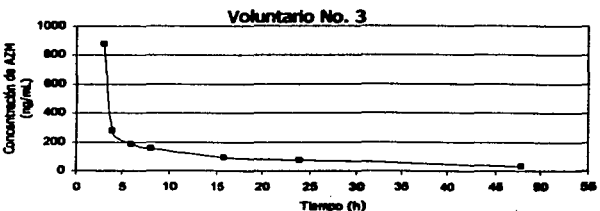
Voluntario No.2

Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	64.32
2	441.01
3	458.20
4	295.61
6	153.58
8	96.86
16	204.66
24	45.73
48	30.02
72	20.75



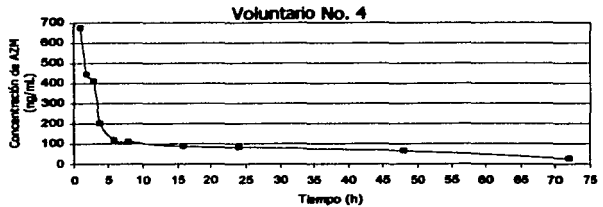
Voluntario No.3

Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	N.C.
2	N.D.
3	873.68
4	280.06
6	184.68
8	154.27
16	92.78
24	72.10
48	25.94
72	N.C.

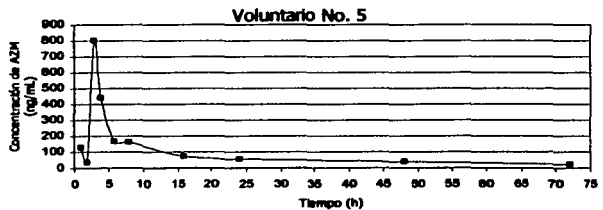




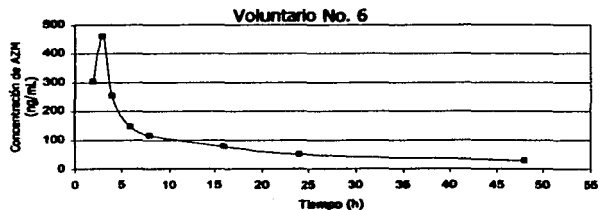
Voluntario No.4	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	673.42
2	444.30
3	409.69
4	198.48
6	116.65
8	107.48
16	85.51
24	81.07
48	64.20
72	28.20



Voluntario No.5	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	128.92
2	30.85
3	799.08
4	440.92
6	167.32
8	161.19
16	72.23
24	58.06
48	37.04
72	23.61



Voluntario No.6	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	N.D.
2	301.94
3	459.83
4	252.69
6	145.60
8	114.91
16	78.28
24	49.68
48	28.43
72	N.C.

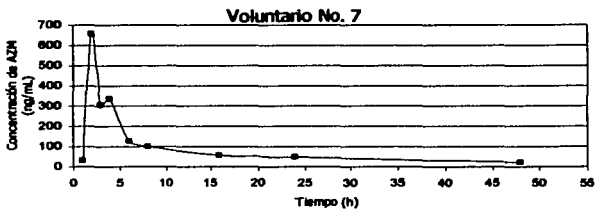






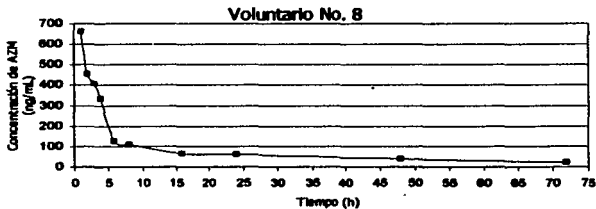
**Voluntario No. 7**

Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	29.81
2	655.87
3	306.32
4	332.82
6	177.65
8	99.93
16	57.52
24	48.48
48	22.94
72	N.C.



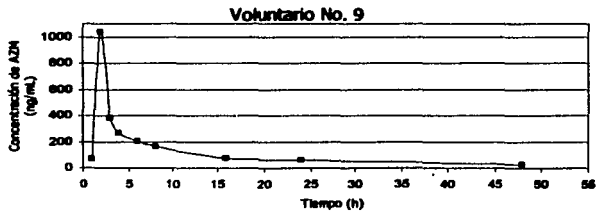
**Voluntario No. 8**

Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	642.33
2	455.20
3	406.90
4	331.81
6	124.94
8	108.75
16	66.53
24	61.15
48	37.52
72	22.20



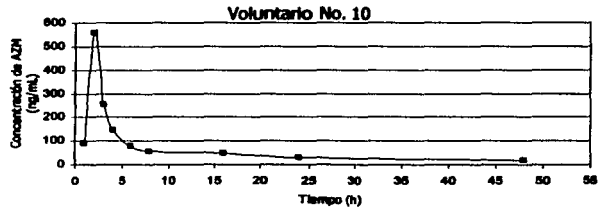
**Voluntario No. 9**

Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	87.32
2	1036.88
3	377.04
4	267.72
6	201.88
8	163.44
16	75.84
24	63.88
48	28.43
72	N.D.



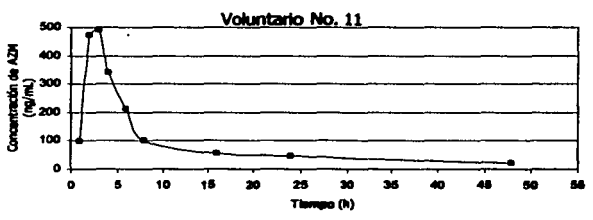
**Voluntario No. 10**

Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	580.09
2	559.54
3	254.49
4	143.62
6	76.88
8	55.79
16	47.11
24	30.54
48	20.38
72	N.C.



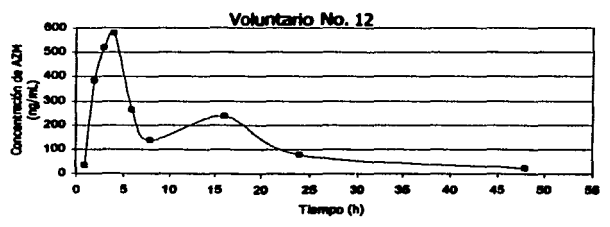
**Voluntario No. 11**

Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	471.16
2	471.67
3	492.33
4	341.16
6	210.11
8	99.74
16	56.17
24	46.81
48	21.52
72	N.C.



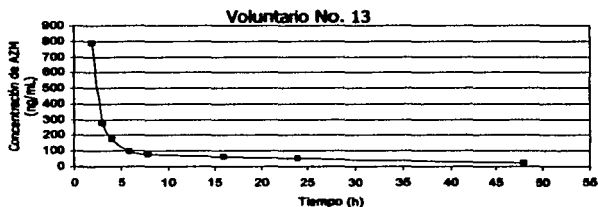
**Voluntario No. 12**

Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	351.16
2	384.46
3	519.62
4	579.49
6	282.21
8	135.21
16	237.00
24	76.30
48	23.88
72	N.C.

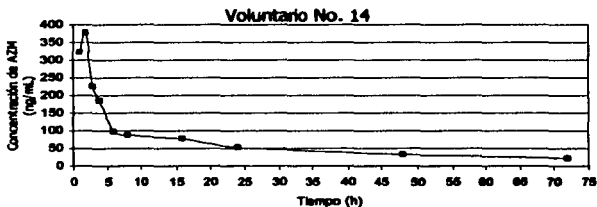




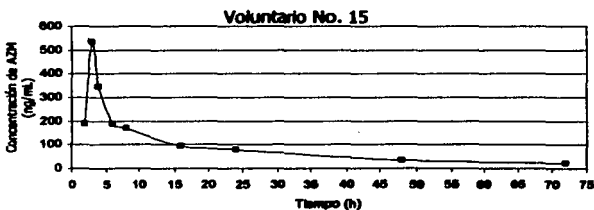
Voluntario No. 13	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	N.D.
2	785.13
3	777.34
4	172.71
6	95.44
8	81.34
16	59.43
24	47.87
48	20.17
72	N.C.



Voluntario No. 14	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	321.91
2	378.51
3	228.80
4	184.80
6	96.82
8	87.96
16	74.41
24	51.97
48	32.83
72	21.47

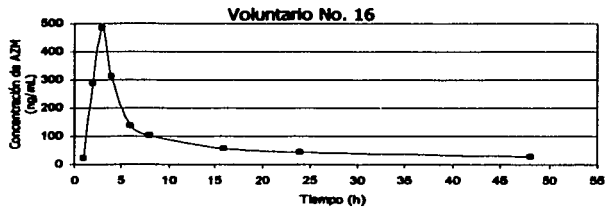


Voluntario No. 15	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	N.C.
2	186.50
3	536.78
4	344.51
6	188.53
8	167.13
16	95.33
24	80.42
48	32.42
72	23.74

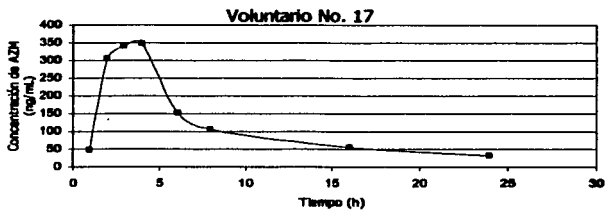




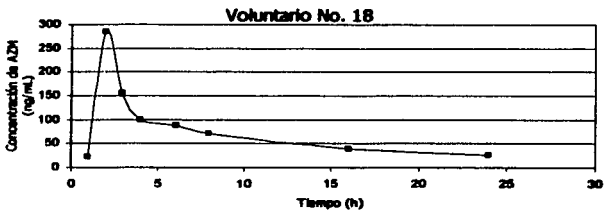
Voluntario No. 16	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	21.83
2	288.04
3	485.78
4	312.80
6	136.08
8	103.93
16	55.86
24	42.27
48	27.54
72	N.C.



Voluntario No. 17	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	48.27
2	305.59
3	340.84
4	347.67
6	153.54
8	105.09
16	55.86
24	32.84
48	N.C.
72	N.D.

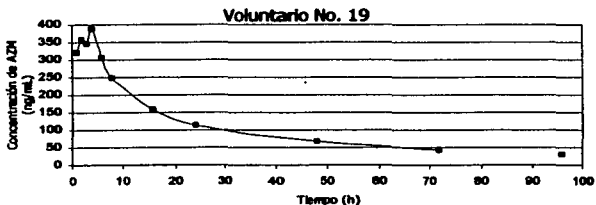


Voluntario No. 18	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	23.16
2	285.71
3	155.53
4	99.43
6	89.02
8	71.18
16	38.22
24	26.73
48	N.C.
72	N.D.

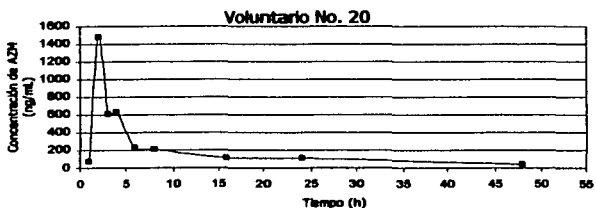




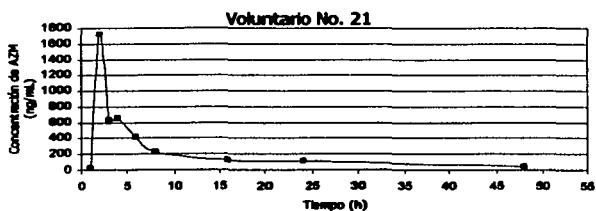
Voluntario No.19	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/ml)
0	0.00
1	320.05
2	357.21
3	345.70
4	386.63
6	305.20
8	248.17
16	154.99
24	113.40
48	68.64
72	41.47



Voluntario No.20	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/ml)
0	0.00
1	68.89
2	1484.82
3	605.89
4	634.74
6	227.05
8	210.13
16	112.33
24	105.02
48	N.C.
72	N.C.

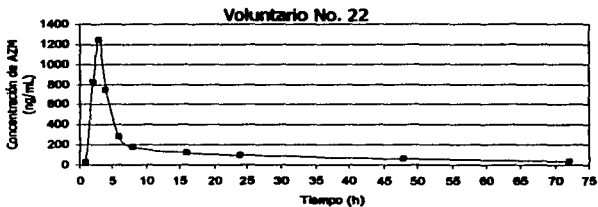


Voluntario No.21	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/ml)
0	0.00
1	21.15
2	1723.70
3	626.53
4	648.38
6	415.72
8	225.69
16	127.83
24	113.93
48	49.78
72	N.C.

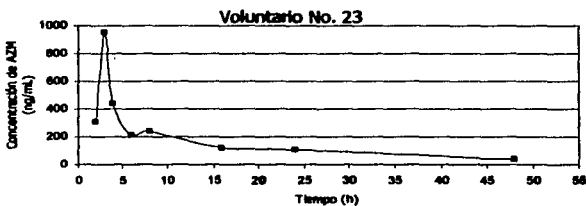




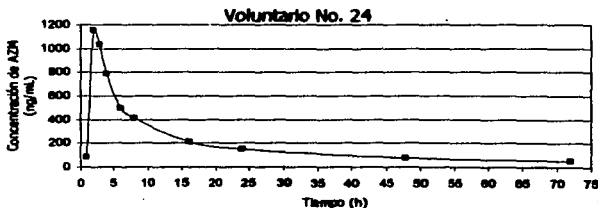
Voluntario No. 22	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	23.58
2	820.86
3	1243.68
4	745.98
6	278.39
8	178.02
16	124.09
24	98.15
48	65.52
72	33.39



Voluntario No. 23	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	N.D.
2	308.64
3	921.98
4	435.47
6	213.98
8	235.95
16	113.79
24	105.80
48	38.32
72	N.D.



Voluntario No. 24	
Tiempo (hrs)	Concentración (ng/mL)
0	0.00
1	80.66
2	1156.82
3	1032.18
4	790.55
6	497.18
8	410.73
16	213.72
24	153.39
48	73.56
72	52.50





## ANEXO III TOXICIDAD DE REACTIVOS

**Acetato de etilo:** Se absorbe por inhalación e ingestión ocasionando la irritación de superficies mucosas, ojos, tracto respiratorio. Es narcótico. En exposiciones repetidas y prolongadas causa irritación de la conjuntiva, córnea y puede ocasionar dermatitis. Altas concentraciones causan congestión de hígado y riñón.

**Acetonitrilo:** *Límite de exposición:* 40 ppm.

*DL50:* 120 mg/kg

Debido a la capacidad de liberación de cianuro su ingestión, inhalación y absorción cutánea puede causar vértigo, respiración rápida, vómito, bochornos, cefalea, somnolencia, caída de la presión arterial, pulso rápido e inconsciencia.

**Ácido clorhídrico:** Su ingestión deriva a un dolor intenso con sensación de quemadura en boca, faringe y abdomen, seguido por vómito y diarrea de sangre precipitada. La presión arterial cae bruscamente. Cuando se inhala provoca tos, cefalea, sensación de ahogo, vértigo y debilidad, opresión torácica, falta de aire, vértigo, esputo espumoso y cianosis. Al contacto directo con la piel se produce un dolor intenso y quemaduras que penetran profundamente la piel. El contacto ocular produce un edema conjuntiva y la destrucción de la córnea.

**Ácido orto-fosfórico:** Su ingestión suele provocar dolor intenso, vómito, diarrea, disminución de la presión arterial. Inhalado provoca tos, sensación de ahogo, cefalea, vértigo, esputo espumoso, cianosis, hipotensión arterial, alta presión. En lesiones en la piel ocasiona dolor intenso, manchas parduscas. En el envenenamiento ocular provoca edema conjuntival, destrucción de la córnea, dolor, lagrimeo y fotofobia.



**Cloroformo:** Puede ser irritante para los ojos, piel y tracto respiratorio. Se considera moderadamente tóxico. Sus órganos diana son el sistema nervioso central, hígado y riñones. Ocasiona dolor de cabeza, vómito, dolor, inconsciencia, somnolencia, latido cardíaco irregular, muerte.

**Diclorometano:** *Límite de exposición:* 100 ppm

*Dosis letal:* 25 mL

El envenenamiento por inhalación e ingestión provoca depresión del SNC dando lugar a inconsciencia y la falta de respuesta a los estímulos dolorosos.

**Éter dietílico:** *Límite de exposición:* 400 ppm

Ya sea por inhalación o por ingestión puede causar inconsciencia, parálisis respiratoria, convulsiones, reducción de la presión arterial, cianosis.

**Fosfato de sodio dibásico:** Se convierte en un purgante cuando se ingiere. Inhalado irrita medianamente las membranas mucosas. En la piel puede causar irritación.

**Hexano:** *Límite de exposición:* 50 ppm

Su inhalación, ingestión o contacto con la piel ocasionan irritación, tos, dificultad para respirar, dolor en el pecho, disturbios gastrointestinales, náusea, dolor de cabeza, vómito. En forma crónica puede causar efectos reproductivos adversos y edema.

**Hidróxido de sodio:** Causa quemaduras severas al contacto con múltiples áreas de destrucción superficial de la piel. Su ingestión provoca quemaduras de boca,





garganta, esófago y estómago. Ocularmente puede destruir el ojo y ocasionar la pérdida de la visión.

**Isopropanol:** Manifestación principal de envenenamiento agudo es la depresión del Sistema Nervioso Central. Se produce náusea, vómito persistente, dolor abdominal, hematemesis, narcosis rebelde al tratamiento, areflexia, respiración deprimida y oliguria seguida de diuresis. Puede ocurrir hiporestesia generalizada y edema. La exposición al vapor puede causar irritación ocular. El contacto prolongado con la piel puede causar corrosión.

**Metanol:** La ingestión, inhalación o absorción cutánea puede ocasionar distintos niveles de envenenamiento con sus síntomas y signos.

*Envenenamiento ligero:* Fatiga, cefalea, náusea y después de un periodo de latencia, visión borrosa temporal.

*Envenenamiento Moderado:* Cefalea grave, desvanecimiento, náusea, vómito y depresión del SNC.

*Envenenamiento Grave:* Aparición de respiración rápida y superficial por la acidosis, aparece la cianosis, coma, caída de la presión arterial, dilatación de las pupilas.

**Terbutil metil éter:** Su inhalación y contacto cutáneo irrita las membranas mucosas y del tracto respiratorio superior; así como ojos.



## GLOSARIO

**Angioedema:** Inflamación dérmica, subcutánea o submucosa, aguda e indolora, de breve duración, que afecta a la cara, cuello, labios, laringe, manos, pies, genitales o vísceras.

**Artralgia:** Dolor de una articulación.

**Astenia:** Falta o pérdida de fuerza o energía, debilidad.

**Cladinoso:** Uno de los dos tipos de azúcar que está unido al anillo de los macrólidos

**Dispepsia:** Sensación de molestia gástrica vaga que se siente después de la ingesta. Combina sensaciones de plenitud, ardor, meteorismo y náuseas.

**Ictericia colestática:** Coloración amarillenta de la piel, mucosas y conjuntivas causada por cifras de bilirubina en sangre superiores a las normales; se encuentra relacionada con la bilis.

**Linfogranuloma venéreo:** Infección producida por una cepa de *Chlamydia trachomatis*. Se caracteriza por la aparición de lesiones genitales ulcerosas con aumento de tamaño de los ganglios linfáticos inguinales, cefalea, fiebre y malestar general.

**Linfoma:** Neoplasia de tejido linfoide en algunos casos benigna, pero por lo general de naturaleza maligna.

**Nefritis intersticial aguda:** Inflamación del intersticio histico del riñon, incluyendo los túbulos. Se debe a una reacción inmunológica frente a ciertos medicamentos. Aparecen fracaso renal agudo, fiebre, erupción y proteinuria. En la mayoría de los casos, al retirar el medicamento lesivo, el riñón recupera su funcionalismo.



**Neutropenia:** Disminución anormal del número de neutrófilos en la sangre.

**Orofaringe:** Una de las tres divisiones anatómicas de la faringe. Se extiende detrás de la boca desde el paladar blando hasta el nivel del hueso hioides.

**Otitis:** Inflamación o infección del oído.

**Parestesia:** Cualquier sensación subjetiva experimentada como entumecimiento, hormigueo o sensación de pinchazos.

**Prueba clastogénica:** Prueba de laboratorio para determinar si un fármaco es capaz de romper a los cromosomas.

**Rash:** Erupción cutánea.

**Síndrome de Lemierre:** Condición médica aguda caracterizada por infección faríngea u odontógena producida generalmente por gérmenes Gram-negativos anaerobios dando lugar a una tromboflebitis séptica de la vena yugular interna con frecuentes metástasis sépticas.

**Síndrome de Stevens-Johnson:** Enfermedad inflamatoria grave que afecta al niño y al adulto joven. Se caracteriza por un comienzo agudo con aparición de fiebre y úlceras en las membranas mucosas de los labios, los ojos, la boca, las vías nasales y los genitales. Todo se acompaña con frecuencia de neumonía, dolor articular y postración. Este síndrome puede corresponder a una reacción alérgica frente a determinados fármacos.

**Tinnitus:** Zumbido de uno de los dos oídos.



## REFERENCIA

1. Goodman, Gilman. **"Las Bases Farmacológicas de la terapéutica"** . Vol. II. 9ª edición. Editorial Mc Graw Hill. (2000).
2. Vademécum Farmacéutico. IPE digital. 9ª edición. Rezza editores. (2000). México.
3. Carta monográfica de TROVAN® /ZITHROMAX® Compliance Pak de Pfizer.
4. Kees F., et.al. **"Determination of macrolides in biological matrices by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection"** ; Journal of Chromatography A, (1998), 812: 278-93.
5. Luke, D., PharmaD, Foulds, G., et. al. **"Disposition of oral azithromycin in humans"** ; Clinical Pharmacology and Therapeutics. (1997), June, 61(6):641-8.
6. Rapp R.P., et.al. **"Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral azithromycin: enhanced tissue activity and minimal drug interactions."** Ann Pharmacother. (1998), Jul-Aug, 32(7-8):785-93.
7. Singlas E., et.al. **"Clinical pharmacokinetics of azithromycin."** Pathol Biol. (Paris) (1995), Jun, 43(6):505-11.
8. Shepard R.M. , Duthu G.S.; **"High performance liquid chromatographic assay with electrochemical detection for azithromycin in serum and tissues"** ; Journal of Chromatography Biomedical Applications, (1991), 565: 321-337.
9. Mehendre, R.P; Tipnis, H.P; **"High performance liquid chromatographic determination of azithromycin from human plasma used electrochemicals detection"**; Indian Drugs, (1995), 2.
10. Sastre J. , Guchelaar H.J.; **"Quantitative determination of macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin in human serum by high - performance liquid chromatography using pre-colum derivatization with 9-fluorenylmethylloxycarbonyl chloride and fluorescence detection"** ; Journal of Chromatography B, (1998), 720: 87-97.
11. Klaus Dieter Riedel; **"Equivalence of a high performance liquid chromatographic assay of azithromycin in human serum samples"** ; Journal of Chromatography, (1992), 576: 358-362.
12. Taninaka C., Ohtani H.; **"Determination of erythromycin, clarithromycin, roxithromycin and azithromycin in plasma by high performance liquid chromatography with amperometric detection"** ; Journal of Chromatography B, (2000), 738: 405-411.
13. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY (Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 6 November 1996 by the ICH Steering Committee)
14. **NOM-177-SSA1-1998** "Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a los cuales deberán ajustarse los terceros autorizados que realicen las pruebas". Diario Oficial de la Federación. Viernes 7 de Mayo de 1999. México.
15. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título 2º, Capítulo 1. México.
16. Aíache J.M., et.al. **"Biofarmacia"**. Manual Moderno. (1983). México.



17. Calderón Fernando. **"Principales antibióticos aminoglucósidos, glucopéptidos y macrólidos; mecanismo de acción, resistencia bacteriana y usos clínicos comunes"**. (2001), Asesor: Raúl Garza Velasco. Facultad de Química. UNAM.
18. Dreisbach R. **"Manual de Toxicología Clínica"**. 6° Edición. Manual Moderno. (1988). E.U.A.
19. **"Diccionario de Medicina Océano Mosby"**. Editorial Océano. (1994). España.
20. Enciclopedia Encarta 2000. Microsoft Corporation.
21. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2000). Secretaría de Salud. México.
22. Fould G., Shepard M., et.al. **"The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues"**; Journal of Antimicrobial Chemotherapy, (1990), 25 Suppl. A: 73-82.
23. Greenwood D. **"Antimicrobial Chemotherapy"**. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford University Press (1995). New York.
24. John E., Conte Jr., et. al. **"Single-Dose Intrapulmonary Pharmacokinetics of Azithromycin, Clarithromycin, Ciprofloxacin, and Cefuroxime in Volunteer Subjects"**; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (1996), Jul, 40(7):1617-22.
25. Joklik, W.K., et.al. **"Zinsser. Microbiología"**. 20° edición. Editorial Médica Panamericana. (1996), Argentina.
26. Kanfer I., et. al. **"Analysis of macrolide antibiotics"**; Journal of Chromatography A, (1998) 812: 225-286.
27. Koneman. **"Diagnóstico microbiológico"**. 3° edición. Editorial Médica Panamericana. (1992), Argentina.
28. Ley General de Salud.
29. Quirasco Alejandra, Serrano Roxana. **"Estudio de biodisponibilidad de Zidovudina (AZT) en población mexicana"**. (2001), Asesor: Luis Jesús García Aguirre. Facultad de Química. UNAM.
30. Ripa S., et.al. **"A linear model for the pharmacokinetics of azithromycin in healthy volunteers."** Chemotherapy. (1996), Nov-Dec, 42(6): 402-9.
31. Wildfeuer H., Laufen H., et.al. **"Comparison of the pharmacokinetics of three-day and five-day regimens of azithromycin in plasma and urine"**; Journal of Antimicrobial Chemotherapy, (1993), 31 Suppl. E:51-56.