



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

RESPUESTAS INDIVIDUALES EN EL METABOLISMO DEL
METRONIDAZOL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A :

MAYRA JARILLO ALVARADO



MEXICO, D.F. **EXAMENES PROFESIONALES**
FAC. DE QUIMICA

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Ernestina Cervera Flores.
Vocal: Prof. Ma. Del Carmen Parra González.
Secretario: Prof. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño.
1er. Suplente: Prof. Luis Tonatihut Sánchez Linares
2o Suplente: Prof. Aurora Lara Nuñez

El presente trabajo se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. y
en el Instituto Nacional de Pediatría.

Asesor: Lourdes Monserrat Sordo Cedeño

Sustentante: Mayra Jarillo Alvarado



The image shows two handwritten signatures in black ink. The top signature is 'Lourdes Monserrat Sordo Cedeño' and the bottom signature is 'Mayra Jarillo Alvarado'. Both are written in a cursive style.

A mi mamá y a mi papá por el amor, el apoyo incondicional, por ser mi guía y por la felicidad que a lo largo de mi vida me han dado.

Por enseñarme a luchar por lo que uno quiere hasta el final.

A mi hermano, por siempre ayudarme a ser alguien mejor y a ver las cosas objetivamente.

A Marco Gianni por su amor, comprensión, paciencia, por los grandes momentos de felicidad que hemos pasado, por crecer juntos y sobre todo,

por ser un Gran Hombre.

Agradecimientos

- ◆ Muy especialmente a la Dra. Patricia Ostrosky. Además de mi gratitud, mi afecto y reconocimiento. Su apoyo personal y profesional fue determinante para que se realizara esta tesis.
- ◆ A la Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo, por su tiempo, dedicación e interés personal en la asesoría del trabajo de tesis.
- ◆ Al Dr. Hugo Juárez Olguín y al Dr. Ismael Lares, por sus recomendaciones metodológicas; así como por las facilidades y apoyo logístico en el desarrollo de las actividades de investigación, parte medular de este trabajo. En el importante quehacer de laboratorio a Alejandra Toledo y a Miriam Carrasco, por sus prácticos y valiosos consejos.
- ◆ A la Dra. Patricia García, por su valiosa guía a lo largo de todo este trabajo. Sus conocimientos y experiencia clarificaron y enriquecieron el enfoque, estructura y alcance del diseño y aplicación experimental.
- ◆ Al Dr. Luis Jesús García, por sus valiosos comentarios y sugerencias para que este trabajo se llevara a cabo.
- ◆ Al Dr. Bocanegra y al Dr. Gabriel Navarrete, quienes de una manera desinteresada, profesional y excelente actitud me ayudaron a sintetizar el metabolito ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol.
- ◆ Al Prof. Francisco Rojo, Profa. Elvia Reynoso y Hortensia Parra, por sus sabios consejos en la aplicación de las tácticas experimentales.
- ◆ A la Profa. Ma. del Carmen Parra y Profa. Ernestina Cervera, por sus observaciones y consideraciones teórico- prácticas en la revisión total para mejorar el trabajo final.

Este trabajo fue apoyado por PAPIIT-DGAPA IN 204502 y CONACYT 40291- M.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.	4
3. ANTECEDENTES.	5
3.1 CARACTERÍSTICAS DEL METRONIDAZOL.....	6
3.2 METABOLISMO.....	7
3.2.1 METABOLISMO DEL METRONIDAZOL EN PARÁSITOS Y BACTERIAS ANAEROBIAS.....	7
3.2.2 LA RELEVANCIA DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE XENOBIÓTICOS.....	7
3.2.3 METABOLISMO DEL METRONIDAZOL EN MAMÍFEROS.....	9
3.4 FARMACOCINETICA.....	12
3.5 INTERACCIONES DEL METRONIDAZOL CON OTROS FÁRMACOS.....	13
3.6 EFECTOS DEL METRONIDAZOL.....	14
3.6.1 Toxicidad.....	14
3.6.2 Genotoxicidad y Carcinogenicidad.....	14
3.6.3 Teratogenicidad y Embriotoxicidad.....	16
3.7 CROMATOGRAFÍA.....	18
3.7.1 Parámetros de Retención.....	19
3.7.2 Coeficiente de reparto.....	20
3.7.3 Selectividad.....	20
3.7.4 Parámetros de eficiencia.....	21
3.7.5 Resolución.....	21
3.7.6 El análisis cuantitativo en cromatografía.....	22
3.7.7 Métodos analíticos descritos para la cuantificación de metronidazol y sus metabolitos.....	23
4 MATERIAL Y MÉTODO	25
4.1. Equipo.....	25
4.2. Reactivos.....	25
4.3. Metodología.....	26
4.3.1 Disoluciones.....	26
4.3.1.1 Disolución amortiguadora de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0.01M, pH= 4.....	26
4.3.1.2 Disolución 0.1 M de CH_3COOH	26

4.3.2 Estandarización de una micro-técnica para la cuantificación de metronidazol y sus dos principales metabolitos en orina.....	27
4.3.2.1. Condiciones cromatográficas para la separación de MTZ-COOH, MTZ-OH, MTZ y E.I.....	27
4.3.2.2 Extracción de MTZ-COOH, MTZ-OH, MTZ y E.I. de la orina.....	28
4.3.3 Validación del método analítico en orina para la cuantificación de metronidazol y sus dos metabolitos principales.....	29
4.3.3.1 Estándares en solución.....	29
4.3.3.2 Estándares en orina	30
4.3.3.3 Parámetros de validación del método	31
4.3.3.3.1 Linealidad	31
4.3.3.3.2 Precisión.....	31
a) Repetibilidad.....	31
b) Reproducibilidad	31
4.3.3.3.3 Exactitud	31
4.3.3.3.4 Recobro	32
4.3.3.3.5 Límite de cuantificación	32
4.3.3.3.6 Límite de detección.....	32
4.3.3.3.7 Estabilidad.....	32
4.3.4 Estudio del metabolismo del metronidazol en voluntarios, mediante el método analítico establecido.....	33
5 .RESULTADOS	34
5.1. Estandarización de una micro-técnica para la cuantificación de metronidazol y sus dos principales metabolitos en orina.....	34
5.2. Validación del método analítico en orina para la cuantificación de metronidazol y sus dos metabolitos principales.....	38
5.2.1 LINEALIDAD.....	38
5.2.2 REPETIBILIDAD	42
5.2.3 REPRODUCIBILIDAD	46
5.2.4 RECOBRO.....	49
5.2.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	49
5.2.6 LÍMITE DE DETECCIÓN.....	50
5.2.7 ESTABILIDAD	51
5.3. Estudio del metabolismo del metronidazol en cuatro pacientes, mediante el método analítico establecido.....	57

6. DISCUSIÓN	73
6.1. Diseño de una nueva micro técnica para la cuantificación en orina de metronidazol y sus dos principales metabolitos.	73
6.2. Validación del método analítico en orina para la cuantificación de metronidazol y sus dos metabolitos principales.	74
6.3 Estudio del metabolismo del metronidazol en cuatro pacientes, mediante el método analítico establecido	78
7. CONCLUSIONES	80
8. BIBLIOGRAFÍA	81
APÉNDICE	86

ABREVIATURAS

α	Selectividad
ABC	Área bajo la curva
AU	Unidades de absorbancia
C.V	Coefficiente de variación
CL	Depuración o aclaración.
CYP	Citocromo P450
CH ₃ CN	Acetonitrilo
D.I.	Diámetro interno.
DC-MTZ	1-(2-hidroxietil)-5-nitroimidazol.
E.I	Estándar interno
F.M	Fase móvil
glcU	Ácido glucurónico
H	Altura del plato
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer
K	Constante de equilibrio
k'	Coefficiente de reparto o distribución, o factor de capacidad
MTZ	1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol, metronidazol
MTZ-2COOH	1-(2-hidroxietil)-2- carboxi-5-nitroimidazol.
MTZ-COOH	Ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol, metabolito ácido del metronidazol
MTZ-glcU	Metronidazol conjugado con el ácido glucurónico.
MTZ-OH	1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol, metabolito hidroxilado del metronidazol.
MTZ-OH-glcU	Metabolito hidroxilado del metronidazol conjugado con el ácido glucurónico.
N	Número de platos teóricos
NC	No cuantificable.
PVDF	Fluoruro de polivinilideno.
r.p.m	Revoluciones por minuto
r^2	Coefficiente de determinación
Rs	Resolución
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media.
t_M	Tiempo muerto.
TNZ	1-[2-(etil sulfonil) etil]-2-metil-5-nitroimidazol, tinidazol.
t_R	Tiempo de retención
t_R'	Diferencia entre t_R y t_M
W	Ancho de la base del pico.

1. INTRODUCCIÓN

Entre los principales problemas de salud pública que aquejan de manera especial a los países en vías de desarrollo— entre ellos México- y sus consecuentes resultados en los índices de mortandad, se encuentran los relacionados con las enfermedades gastrointestinales, que inciden en amplios sectores de la población; pero más abrumadoramente en la que, paradójicamente, debiera ser la menos desprotegida: la infantil.

En México las estadísticas de mortandad muestran que la primera causa de muerte en niños de 1 a 4 años de edad es provocada por enfermedades gastrointestinales. Estos indicadores, que corresponden a una incipiente etapa de la vida humana, contrastan -de una manera dolorosa para todos, pero de una manera particular confrontan retadoramente al científico-, con los avances que pregonan nuestro siglo; ya que por el natural desarrollo de cualquier población en el momento actual de la ciencia, estas enfermedades que afectan a la parte de la población más apreciada deberían haber sido prácticamente eliminadas.

El tratamiento para combatir las enfermedades infecciosas referidas, causadas por microorganismos anaerobios y protozoarios que provienen de ambientes asociados a carencia de higiene en la manipulación de los alimentos y entornos insalubres, debiera involucrar acciones educativas y mejores condiciones sociales; mismas que constituyen, precisamente, el talón de Aquiles de las naciones que las padecen. Por ello la esencia del tratamiento se apoya en el combate químico farmacológico de tales microorganismos, mediante el empleo de diversos medicamentos. Entre ellos, uno de los más conocidos y aplicados en el sector salud es **el metronidazol: 1-(2-hidroxi-etil)-2-metil-5-nitroimidazol o MTZ**; cuyo uso ha despertado importantes controversias sobre la posibilidad de ser un agente genotóxico y/o carcinogénico con las trascendentes consecuencias en la amplia población en la que se aplica.

Por ello en el laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM; se desarrollaron diversos estudios en los cuales; se encontró que el MTZ produce daño genotóxico en linfocitos; y que este daño no correlaciona directamente con la concentración detectada de metronidazol en plasma; por lo que se planteó la posibilidad de que el daño genotóxico fuera el resultado de las diferentes cantidades de metabolitos de metronidazol generados por cada individuo; surgiendo así la necesidad de llevar a cabo una investigación que dilucidara si había dichas diferencias individuales en el metabolismo del metronidazol en personas bajo tratamiento con este fármaco, pretendiendo plantear en un futuro, si el daño genotóxico se encuentra relacionado a variables individuales asociadas con el metabolismo de este compuesto.

Para obtener resultados significativamente confiables en el estudio de la cuantificación de metronidazol que se encuentra en el organismo y sus productos de biotransformación en cada persona y así determinar la existencia de las diferencias individuales, se requiere de un método analítico validado que cumpla con los criterios de linealidad, selectividad, precisión y exactitud, para la cuantificación del metronidazol y sus dos principales metabolitos. Para lo cual se desarrolló una nueva micro-técnica, utilizando el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en la que se establecieron nuevas condiciones cromatográficas para la detección de metronidazol y sus principales metabolitos en orina, empleando un estándar interno y con ello una mayor confiabilidad en los resultados.

La presente investigación constituye una aportación en el desarrollo de las técnicas y estudios para determinar la viabilidad del uso del metronidazol, en función de su posible genotoxicidad y el futuro de sus alternativas de aplicación para combatir efectivamente y sin consecuencias negativas uno de los problemas de salud más acuciantes en nuestro país.

Para el presente trabajo la hipótesis que se planteo fue la siguiente:

Utilizando el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) se podrá cuantificar en orina los dos principales metabolitos del metronidazol: 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol (MTZ-OH) y ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol (MTZ-COOH), en individuos tratados con este medicamento y se determinarán las diferencias entre ellos.

2. OBJETIVOS.

Objetivo General:

- ◆ Determinar si existen diferencias individuales en el metabolismo del MTZ.

Objetivos Particulares:

- ◆ Diseñar y validar un método analítico para la cuantificación del 1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (MTZ), 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol (MTZ-OH) y ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol (MTZ-COOH) en orina; por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución.
- ◆ Aplicar el método analítico establecido a un estudio piloto en voluntarios y obtener las cantidades excretadas tanto del metronidazol como de sus dos principales metabolitos; así como sus parámetros farmacocinéticos.

3. ANTECEDENTES.

En el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales, que representan uno de los mayores problemas de salud pública en los países en vías de desarrollo y en particular en México, se ha utilizado el fármaco comúnmente denominado metronidazol (MTZ), debido a sus características como antibacteriano y antiprotozoario; así como al fácil acceso del mismo por parte de poblaciones de bajos recursos.

Este compuesto se sintetizó en 1957 y se usó por vez primera en Europa en 1959 como antiprotozoario: contra *trichomonas vaginalis*, en 1966 se estudió para *Entamoeba histolytica* y, más tarde, en la década de los 70s se empleó para *Giardia lamblia*^[1] y es hasta esa época que cobra importancia para el tratamiento de microorganismos anaerobios gram-negativos como los siguientes: *Bacteriodes ssp (fragilis)*, *Actinobacilus*, *Campylobacter fetus*, *Helicobacter pilory* y anaerobios gram-positivos como: *Peptostreptosoccus*, *Clostridium perfringes*, y *Clostridium difficile*^[2]

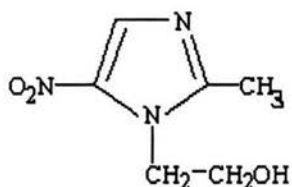
Actualmente, el metronidazol se encuentra en la lista de medicamentos esenciales señalados por la OMS como uno de los antibacterianos más seguros y eficientes^[3]; debido a esto y a su amplio espectro como antibacteriano y antiprotozoario, se emplea en el tratamiento de abscesos intrabdominales, pulmonares, hepáticos y cerebrales; así como en infecciones de articulaciones, huesos y en enfermedades como: meningitis, endocarditis, septicemia, neumonía y peritonitis^[4]. A demás se usa en el tratamiento de la enfermedad de Crohn's (enfermedad intestinal provocada por *Mycobacterium avium* subespecie de la paratuberculosis^[5]), en profilaxis de infecciones por microorganismos anaerobios y microaerofilicos de post-cirugías y como sensibilizador de células hipóxicas a la radiación^[6].

No obstante lo anterior, el metronidazol está clasificado por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) como fármaco del grupo 2B, es decir que se tienen suficientes evidencias acerca de su carcinogenicidad en animales, pero no así en humanos; por ello se clasifica como posible carcinógeno en nuestra especie ^[7]. Los estudios que se han realizado al respecto se comentan más adelante.

3.1 CARACTERÍSTICAS DEL METRONIDAZOL.

El **1-(2-hidroxiethyl)-2-metil-5-nitroimidazol** llamado frecuentemente metronidazol, es el principio activo del flagyl, amydazol, flagenase, fusanidazol, metricom, metroson, nidroxol, retofar, trichaso, trivazol, tricocet, orvagil, sanizol; selegil y vertisal entre otros.

Su fórmula molecular es la siguiente:



Y su fórmula condensada es: $C_6H_9O_3N_3$, sus cristales son de color blanco o amarillo pálido, es inodoro, es estable al aire y se oscurece con la luz; su punto de fusión es de 159 - 163°C; tiene un peso molecular de: 171.16 g/mol.

Su solubilidad en agua a 20°C es de 1.0g/100 mL; en etanol es de 0.5 g/100 mL; en éter y en cloroformo es menor a 0.05 g/100mL; y es soluble en ácidos diluidos y en acetona^[8].

3.2 METABOLISMO

3.2.1 METABOLISMO DEL METRONIDAZOL EN PARÁSITOS Y BACTERIAS ANAEROBIAS.

El metronidazol es reducido en condiciones intracelulares, especialmente dadas por bacterias anaerobias y protozoarios^a, en donde la ferredoxina le transfiere un electrón a la molécula de MTZ, produciendo la reducción del grupo nitro; lo que lleva a la formación de compuestos intermedios^b, de vida media corta, citotóxicos^[9]. El MTZ reducido causa el rompimiento del DNA, además inhibe la síntesis y formación de compuestos; ya que forma aductos con RNA, DNA y proteínas de la célula; provocando con ello la muerte del patógeno^[1,4,9,10].

3.2.2 LA RELEVANCIA DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE XENOBIÓTICOS

Las reacciones de biotransformación ocurren dentro de la célula (retículo endoplásmico, mitocondria, citoplasma, etc.) y se llevan a cabo para facilitar la excreción (en orina o bilis) de compuestos endógenos, convirtiéndolos así, en productos más polares; estas reacciones se clasifican en reacciones de fase I y fase II. Las reacciones de **fase I** se caracterizan por ser de oxidación, reducción y de hidrólisis y con ello, tener como productos, moléculas con grupos funcionales como los siguientes: -OH, -NH₂, -SH o -COOH.

La **fase II** comprende las reacciones de acetilación, metilación y reacciones de conjugación con: ácido glucurónico, sulfato, glutatión y aminoácidos. Los compuestos que provienen de la fase I pueden ser sustratos de esta fase y viceversa; asimismo, la biotransformación de fase II es más rápida y se sabe que los productos de esta fase son más hidrofílicos^[11].

^a Esto es debido a que el potencial redox del MTZ es más positivo que el de los microorganismos anaerobios y más negativo que el de los aerobios^[10].

^b Se ha propuesto que uno de estos intermedios reducidos es el ácido N-(2-hidroxi-etil) oxámico que forma enlaces con biopolímeros nucleofílicos de la célula, como por ejemplo el DNA^[9].

Antecedentes

Las moléculas resultantes de estas biotransformaciones pueden llegar a ser intermediarios reactivos citotóxicos; ya sea produciendo un daño local o transportándose a otros tejidos. La toxicidad de los metabolitos se ha relacionado con su biotransformación oxidativa; aunque se ha observado que algunos compuestos como aminas heterocíclicas O-acetiladas y compuestos conjugados con glutatión han resultado ser también tóxicos^[12].

Las enzimas que llevan a cabo estas reacciones de biotransformación se encuentran distribuidas en todo el organismo, en compartimentos subcelulares como son: retículo endoplásmico (microsomias), o en la fracción soluble del citoplasma (citosol) y, en menor proporción, en mitocondria y lisosomas. Se encuentran principalmente en hígado; pero también pulmón, placenta, epitelio, mucosa nasal y tracto gastrointestinal presentan grandes cantidades de estas enzimas; asimismo se han encontrado en páncreas, corazón, cerebro, riñón, bazo, testículos, ovarios, plasma, eritrocitos, plaquetas, linfocitos y aorta^[11].

Las enzimas que predominan en el metabolismo oxidativo microsomal (fase I) son las monooxigenasas^c: flavina monooxigenasa y citocromo P450; ésta última contiene dos enzimas: citocromo reductasa P450 –NADPH y citocromo P450^[13].

Las enzimas P450 son cadenas de polipéptidos de 500 aminoácidos y de 50 kDa; todas contienen un grupo hemo prostético con 50 tiolatos (provenientes de cisteínas) como ligantes; el grupo hemo de la enzima está expuesto en la cara distal^d, lo que le da el potencial redox negativo, relativamente alto comparado con otros citocromos^e. Al ser reducido el Fe^{3+} a Fe^{2+} se puede coordinar con una molécula de oxígeno (O_2) y con monóxido de carbono (CO)^[11]. El citocromo P450 es la familia de enzimas más versátiles

^c Estas enzimas que metabolizan vía oxidativa microsomal son enzimas, que a partir de una molécula de oxígeno y NADPH, incorporan al sustrato un átomo de oxígeno y el otro átomo es reducido como agua^[11].

^d Aproximadamente el 40% del grupo hemo está expuesto y se coordina con el agua en ausencia de sustrato^[15].

^e El potencial estándar del sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ de la mayoría de los citocromos es positivo y los ligantes del grupo hemo son metioninas e histidinas o solo histidinas; en cambio para el citocromo P450 el $E^\circ \text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ es de -400 mV, y depende de las isoformas de la enzima y del potencial redox del sustrato^[16].

en términos catalíticos. Se han reportado alrededor de 100 enzimas P450, las cuales se han clasificado en 13 familias; de la I-IV están involucradas principalmente en el metabolismo de compuestos exógenos y de la V-XIII de compuestos endógenos^[12].

La actividad de estas enzimas esta determinada genéticamente y por el medio ambiente en que se encuentran. Se sabe que el tabaco, la actividad física, los crucíferos, la carne asada a la leña, el jugo de toronja, la cafeína y el chocolate; así como ciertos fármacos como fenitoína y antipirina, además de la exposición a hidrocarburos o compuestos halogenados inducen la actividad de algunas enzimas P450. Se ha asociado la inducción y la inhibición de estas enzimas con la adquisición de susceptibilidad a ciertas enfermedades^[9,12].

El metronidazol es un medicamento que es metabolizado por el citocromo P450.

3.2.3 METABOLISMO DEL METRONIDAZOL EN MAMÍFEROS.

El metabolismo del metronidazol en mamíferos es oxidativo y reductivo. En mamíferos la reducción del grupo nitro se debe a las flavoproteínas como NADPH-citocromo c (P450)-reductasa, xantina-oxidoreductasa, aldehído-oxidasa, entre otras enzimas.

En mamíferos se ha observado que la biotransformación del metronidazol es por vía oxidativa (fase I) y de conjugación (fase II), teniendo diferentes cantidades de metabolitos entre especies. No se sabe que familia de citocromo P450 metaboliza el metronidazol; Loft sugiere que la familia del CYP 2E1 (en primera etapa) y CYP 1A1 pueden estar involucrados en su metabolismo^[12,14].

El metabolismo de oxidación se lleva a cabo en la cadena alifática en la posición 1 y 2, obteniéndose así los metabolitos: ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol (MTZ-COOH) y 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol (MTZ-OH). En el hombre el 40% de la dosis es metabolizada en MTZ-OH, y del 15 al 20% en MTZ-COOH.

El metabolito MTZ-OH se puede volver a oxidar en la posición 2 del nitroimidazol y formar el ácido carboxílico: 1-(2-hidroxietil)-2-carboxi-5-nitroimidazol (MTZ-2COOH),

este grupo carboxilo puede salir como CO_2 y formar el 1-(2-hidroxietil) -5-nitroimidazol (DC-MTZ), figura 1.

El metronidazol se puede conjugar en la posición 1 con el ácido glucurónico y con sulfato (MTZ-glcU y MTZ-SO₄), su metabolito MTZ-OH puede conjugarse también en la posición 1 y 2 con el ácido glucurónico (MTZ-OH-glcU); ver figura 1.

No se sabe con precisión cuánto del metabolito MTZ-OH se vuelve a oxidar para MTZ-2COOH; aunque se estima que es alrededor del 10%. En el metabolismo de fase II en el hombre solo se presenta la conjugación del metronidazol con ácido glucurónico; que es del 7% y no se lleva a cabo la sulfatación, la cual sí se da en ratas y mayoritariamente en hembras, siendo entre el 7 y el 11% para éstas, y alrededor del 2% para los machos. Se han visto también diferencias ligadas al sexo en ratas en el metabolismo de fase II en la conjugación del MTZ con ácido glucurónico: en hembras es menor (3% al 11%); que en machos (25%). Además en ésta especie el metronidazol se metaboliza del 3-8% en MTZ-OH; la oxidación de este metabolito (MTZ-2COOH) es relativamente baja (0.2%) y la conjugación de MTZ-OH no se lleva a cabo. El metabolito MTZ-COOH se obtiene del 0-5% de la dosis administrada de metronidazol^[12] en esta especie, así mismo, el MTZ es metabolizado en acetamida y ácido N-(2-hidroxietil) oxámico^[15]. En el humano el 15% de la dosis es excretada en forma inalterada; en cambio en la rata varía en el rango del 15 al 37%^[12].

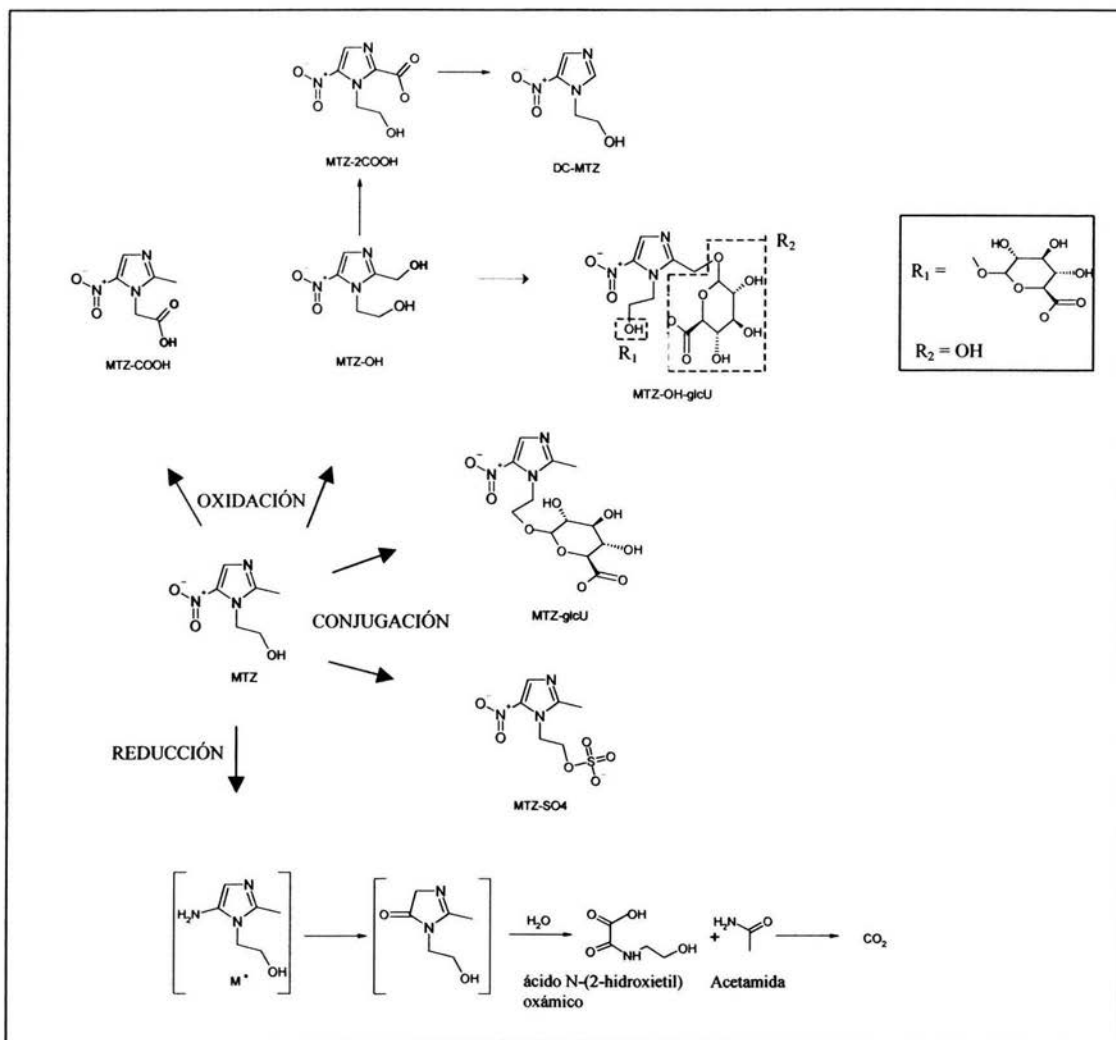


Figura 1. Metabolismo del metronidazol en mamíferos (tomado y modificado de Thomsen^[40]1995 y Loft. 1990^[12]).

3.4. FARMACOCINÉTICA.

El metronidazol se absorbe en al menos el 80% de la dosis administrada por vía oral (a dosis bajas es prácticamente del 100%); por vía rectal e intravaginal la absorción es menor, alrededor del 67 al 82% y del 20 al 56% respectivamente^[9]. Su unión a proteínas es relativamente baja, menor al 20%^[4]. Del 60 al 100% de la concentración plasmática de metronidazol se alcanza en diversos tejidos como: hígado, pulmón, huesos, saliva, bilis, líquido seminal, leche materna, secreciones vaginales y sistema nervioso central^[9]. Cruza

placenta y barrera cerebral^[4]; aunque en placenta no se alcanzan altas concentraciones de este compuesto^[9].

En la administración oral del fármaco las concentraciones plasmáticas se alcanzan en 1 ó 2 horas^[4].

La concentración máxima (C_{máx}) de MTZ en leche materna, es de 15.5 µg/mL y de 5.7 µg/mL para MTZ-OH en un tratamiento de 400 mg tres veces al día. En el plasma del lactante las concentraciones de MTZ son de 1.27-2.41 µg/mL y de MTZ-OH 1.1-2.4 µg/mL^[20].

La principal vía de eliminación de este medicamento es por vía renal: de un 60% a un 80% de la dosis administrada; y del 6 al 15 % de metronidazol es excretado por las heces fecales^[9]

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) del metronidazol en personas con funcionamiento renal y hepático normal es de 8 horas (de 6-12 h.); no así en personas que padecen enfermedades del hígado donde el $t_{1/2}$ es de 18 horas (con un intervalo de 10 – 29 h.)^[4]. El volumen de distribución del MTZ es de 0.55 a 1.1 L/Kg, la depuración (CL) es de 0.921 ± 0.175 L/Kg/h, su constante de absorción (K_a) por vía oral es de 3.02 h^{-1} , su constante de distribución (K_d) es de 0.12 h^{-1} El $t_{1/2}$ de MTZ-OH es de 11.1 ± 1.8 h.

Los parámetros farmacocinéticos se ven alterados con: las enfermedades (del hígado, riñón, etc.); la administración conjunta de medicamentos, la edad, la obesidad y la desnutrición; entre otros. En niños y ancianos la depuración corporal total del MTZ (Cl) es menor y el tiempo de vida media de eliminación es mayor que en un adulto^[18]. En sujetos desnutridos se observa que la depuración de éste fármaco está disminuida^[19].

3.5 INTERACCIONES DEL METRONIDAZOL CON OTROS FÁRMACOS.

La interacción del metronidazol con diversos fármacos ha sido estudiada, a fin de determinar la potencial modificación de los parámetros farmacocinéticos. En el caso del omeprazol es nula, pues éste no altera ningún parámetro farmacocinético del metronidazol^[21,22]. De igual manera ocurre con la administración conjunta de: teofilina, alprazolam, lorazepam, diazepam, ciprofloxacina, sucralfate^[23] o sulfasalazina; pero no así con: alcohol, S-warfarina, disulfiram, fenitoína, litio, fenobarbital, antipirina, prednisona, rifampicina, cimetidina y colestiramina, que sí alteran la farmacocinética del metronidazol^[18], ya que algunos de estos medicamentos son metabolizados por el CYP 2C9 y se sabe que el metronidazol inhibe la actividad de este citocromo; así como también los sustratos del CYP 3A^[24].

Este fármaco se emplea en el tratamiento del alcoholismo por el efecto antabuse (disulfiram) que se le ha asociado; sin embargo en los estudios donde se ha propuesto esto no muestran pruebas suficientes de que dicha reacción se lleve a cabo^[25].

3.6 EFECTOS DEL METRONIDAZOL.

El metronidazol es uno de los 5-nitroimidazoles más estudiados desde el año de 1960; tanto por su uso como fármaco de amplio espectro, como por su controversia en cuanto a sus efectos en el ser humano; habiéndose realizado diversos experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, a fin de obtener información sobre su interacción con biomoléculas como DNA, RNA y proteínas, en células procariotas y eucariotas.

3.6.1 Toxicidad.

Pueden existir reacciones adversas en los individuos que estén bajo tratamiento terapéutico con MTZ, raramente severas para la suspensión del mismo, tales como: náusea, cefaléa, sabor metálico, en ocasiones dolor abdominal, anorexia, náusea, vómito, orina de color pardo-rojizo. A dosis elevadas se pueden presentar efectos como: mareos y vértigos. Raramente se presentan: neuropatía periférica (reversible), ataxia, convulsiones, encefalopatía y confusión^[26].

3.6.2 Genotoxicidad y Carcinogenicidad.

La mutagenicidad del MTZ en bacterias se demostró en 1974 por Voogd y cols.^[27], misma que se debe, principalmente, al cambio de pares de bases en el DNA. Adicionalmente, la actividad carcinogénica del metronidazol en roedores fue demostrada por Rustia y Shubik en 1972^[28]. Estudios *in vitro* hechos por La Russo y cols. en 1977^[29] demostraron que en condiciones reductoras, el MTZ reducido forma enlaces covalentes con las bases guanina y citosina del DNA, tanto de células eucariotas como procariotas. En el mismo año, se demostró que la genotoxicidad del MTZ es debida a que éste causa rompimiento sencillo y de doble cadena del DNA^[9]. Simultáneamente a estos estudios Connor y cols (1977)^[30].

estudiaron *in vitro* los dos principales metabolitos del MTZ en humano; se probaron con *Salmonella typhimurium* TA1535 y demostraron que el MTZ-OH tiene 10 veces más actividad contra esta cepa que el mismo MTZ; no así para el MTZ-COOH, el cual no mostró tener ningún efecto^[27]. De la misma manera, Ralph y Amatnieks (1980) demostraron *in vitro* que el MTZ-OH tiene mayor actividad en *haemophilus vaginalis* que el MTZ; el MTZ-COOH fue el compuesto que mostró menor actividad en los estudios realizados^[31].

Se sabe que el metronidazol en roedores es metabolizado en acetamida y ácido N-(2-hidroxietil) oxámico^f. Estos compuestos altamente tóxicos (forman enlaces con el DNA) provienen del metabolismo de la flora intestinal^g; esto se reafirma en estudios hechos en ratas libres de estos microorganismos donde no se excretan estas moléculas^[9]. En humanos se han encontrado pequeñas cantidades de estos compuestos en orina^[15] y la cantidad de estos metabolitos difiere entre especies^[9]. Estudios en ratas demuestran que el tratamiento a altas dosis de acetamida produce hepatocarcinoma^[15]; de la misma manera que el MTZ a dosis muy elevadas (500 mg/Kg/día) en ratones machos ha provocado tumores hepáticos, como también en ratas hembras bajo tratamientos prolongados; además, se ha reportado que en ratas se incrementa la incidencia de cáncer mamario, pituitario y testicular^[4,32].

En estudios de linfocitos humanos tratados *in vitro* con MTZ y sus dos principales metabolitos, MTZ-OH y MTZ-COOH, a concentraciones de 1 mg/mL, en donde se analizaron aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas y la síntesis de DNA, no se encontró actividad genotóxica, ni con MTZ, ni sus dos metabolitos principales, ni tampoco una aparente inhibición en la síntesis de DNA con estos compuestos (como en

^f La biotransformación en la célula, de compuestos con grupos nitro a compuestos como aminas primarias e hidroxilaminas, son reacciones que se dan de manera normal en el metabolismo de estos compuestos^[9].

^g Estos seres vivos contienen grandes cantidades de nitroreductasas.

el caso del compuesto mostaza y el metil metanosulfonato donde si ocurre); además estos compuestos no provocan una reparación del DNA, aún a altas concentraciones (1000 µg/mL)^[33]. En contraste, otros estudios hechos *in vitro*, muestran que el metronidazol produce daño en el DNA de linfocitos humanos a dosis-respuesta, y esta genotoxicidad decrece en presencia de la fracción S9, y lo mismo sucede en condiciones anaeróbicas. Este daño producido por MTZ es modulado por antioxidantes como: vitamina C, 8-hidroxiquinolina, catalasa y superóxido dismutasa^[34].

Un estudio que sugiere que el MTZ es mutagénico en mamíferos es el de Ostrosky y cols; en el cual, a nueve ovejas se les administró 1gr de metronidazol durante 10 días, y sus resultados muestran que hay una marcada relación entre la frecuencia de linfocitos mutados y la concentración de MTZ en plasma^[35]. Adicionalmente, en estudios realizados por el mismo grupo de investigación, con 10 hombres sanos, tratados con 500 mg de MTZ cada ocho horas durante 10 días, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células con rompimientos. Además en este trabajo se encontró, que el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas no correlaciona con las concentraciones de plasma encontradas en los individuos; así mismo, se observaron diferencias individuales, tanto en la inducción de aberraciones cromosómicas como en la concentración de MTZ en plasma^[36].

3.6.3 Teratogenicidad y Embriotoxicidad.

La administración de MTZ en ratones preñados, así como en ratas y en cerdos de guinea a dosis iguales a las del humano, causan fetotoxicidad^[4,9]. La administración por separado de etanol y metronidazol a ratones preñados resulta en fetotoxicidad y teratogenicidad; y al administrarlos conjuntamente el efecto es aditivo^[37].

En contraste, estudios hechos en mujeres embarazadas en diferentes etapas de la gestación no han reportado alteraciones contundentes asociadas con el MTZ; ni tampoco se han

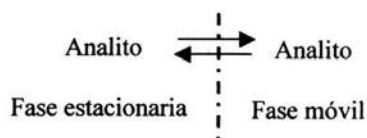
encontrado niños prematuros; ni de baja talla. Los estudios de Morgan en 597 pacientes embarazadas que estuvieron bajo tratamiento con metronidazol en un periodo de 7 a 10 días; los de Rodin y Haas en 61 mujeres embarazadas que durante 7 días estuvieron con 200 mg de MTZ tres veces al día; así como los de Roe^[38], Aselton y los resientes hechos por Moskovitz y *cols*, no observaron ningún efecto en mujeres embarazadas bajo tratamiento con este fármaco^[9, 39]. Muy pocos estudios han presentado un incremento en el riesgo de tener partos prematuros; así como efectos en los niños de madres que fueron tratadas con este fármaco y, en este último caso, los efectos no se han relacionado con el tratamiento de MTZ^[9]. Si bien este medicamento no aparenta tener un efecto teratogénico, se debe de tomar en cuenta que atraviesa placenta; por lo que es necesario un mayor número de estudios respecto a su administración en mujeres embarazadas, analizando también el riesgo beneficio. Hasta ahora únicamente está contraindicado en el primer trimestre del embarazo.

Con base en todo lo expuesto se pone de manifiesto que el MTZ es mutagénico, carcinogénico y teratogénico en animales; pero existen controversias en los estudios hechos en humanos. Un compuesto puede provocar la aparición de carcinomas hasta 20-25 años después de haber estado en contacto con dicho compuesto^[9]. Aún cuando, en las conclusiones de diversos estudios sobre la aplicación terapéutica del fármaco a humanos, desde la década de los años 60, no existen datos claros de su carcinogenicidad, la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) recopiló en 1987 estudios, donde, se presenta un aumento significativo de carcinomas asociado a la administración de MTZ, como otros estudios que se contraponen. Por ello la IARC clasifica al metronidazol como fármaco del grupo 2B, es decir que se tienen suficientes evidencias a cerca de su carcinogenicidad en animales, pero no así en humanos; por ello se clasifica como posible carcinógeno en humanos^[7,32].

3.7 CROMATOGRAFÍA.

Es una herramienta de gran utilidad para separar, identificar y cuantificar los compuestos químicos de una mezcla además de ser rápida es relativamente de bajo costo. Esta técnica consta de una fase móvil y una fase estacionaria, la separación se basa en la adsorción selectiva de los analitos a la fase estacionaria, mientras la fase móvil los eluye. La cromatografía se clasifica de acuerdo a las características de la fase estacionaria y la fase móvil; además de tomar en cuenta la clase de equilibrios implicados entre los solutos y las fases. Por tanto se tienen tres grandes clases de cromatografía: la de gases, la de fluido supercrítico y la de líquidos. En este trabajo nos enfocaremos a esta última.

Los compuestos se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria, esta transferencia entre las dos fases se describe en cromatografía como sigue:



Para este sistema la constante de equilibrio K se define como:

$$K = \frac{[\text{Analito}]_{\text{Fase estacionaria}}}{[\text{Analito}]_{\text{Fase móvil}}}$$

En la cromatografía de fase reversa comúnmente se emplea como fase estacionaria empaques C18, C8, C4, fenil y en el caso de la fase móvil se utilizan solventes polares como: agua, metanol, acetonitrilo. Los compuestos que pueden ser detectados son: compuestos neutros, ácidos y bases débiles entre otros

3.7.1 Parámetros de Retención.

La figura 2 muestra un cromatograma característico de la separación de una mezcla de dos compuestos, donde se observan claramente los parámetros cromatográficos para el compuesto 1 y para el compuesto 2. **El tiempo de retención, t_R** , se define como el tiempo en que el analito permanece en la columna. **El tiempo muerto, t_M o t_0** , como el tiempo que tarda en recorrer una molécula no retenida la columna. Y **t_R'** como el tiempo en que el analito es retenido por la fase estacionaria; para el compuesto 1 se obtiene de la siguiente manera: $t_R'(1) = t_R(1) - t_M$. **W** es el ancho del pico en la base de éste, y se obtiene trazando las tangentes en los puntos de inflexión a los dos lados del pico cromatográfico hasta formar un triángulo con la línea base (ver figura 2).

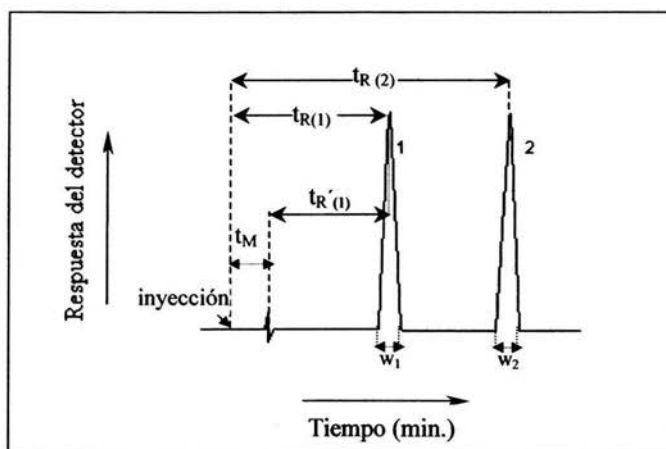


Figura 2. Cromatograma característico de la separación de dos compuestos de una mezcla, donde se muestran: t_M (tiempo muerto), t_R (tiempo de retención), t_R' (diferencia entre t_R y t_M) y W que es el ancho de la base del pico.

3.7.2 Coeficiente de reparto, de distribución o factor de capacidad (k').

Es característico para cada compuesto en el sistema establecido (cierta fase móvil, fase estacionaria y temperatura) y se emplea para analizar la velocidad de migración de los compuestos en la columna.

$$k'_1 = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

En esta ecuación se puede observar que k' es inversamente proporcional a la fuerza del solvente.

Para obtener una buena separación entre los compuestos, los valores de k' deben estar entre 2 y 10, mayor a 10 los tiempos de retención son demasiado largos y menores a 2 son tan pequeños que son difíciles de determinar.

3.7.3 Selectividad (α)

Es la separación relativa entre dos picos e influye de una manera directa en la resolución de un sistema cromatográfico.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

El valor de α debe ser mayor de 1.2 para tener una buena separación entre los compuestos del sistema en estudio. Esto se puede lograr modificando la composición de la fase móvil o la fase estacionaria. La selectividad entre moléculas ionizadas y neutras se puede cambiar con el pH.

3.7.4 Parámetros de Eficiencia.

La eficiencia de una columna se puede determinar cuantitativamente a partir de dos parámetros: la **altura del plato (H)** y el **número de platos teóricos (N)**:

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{W} \right]^2$$

De esta manera podemos ver que N puede calcularse a partir de dos medidas: tiempo de retención y ancho del pico. Para calcular la altura del plato, H, se debe conocer la longitud de la columna: $N=L/H$; donde, L es la longitud de la columna.

3.7.5 Resolución (Rs).

Es una medida cuantitativa de la capacidad para separar dos analitos.

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_A + W_B}$$

Cuando R_s es igual a 1.0 significa que el 4% de las señales de ambos compuestos se superpone entre sí y cuando R_s es igual a 1.5 significa una separación completa entre los dos compuestos (hay un solapamiento del orden de 0.3%).

La resolución entre dos picos depende directamente de la selectividad, del factor de capacidad y del número de platos teóricos de la siguiente manera:

$$R_s = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \frac{N^{1/2}}{4}$$

En este caso k' es el promedio de los dos factores de capacidad de los dos compuestos.

Para obtener una separación adecuada entre compuestos se tiene, entonces, que tomar en cuenta α , k' , y N (o H); estos parámetros se pueden ajustar de una manera relativamente independiente; por ejemplo: se puede asumir que es constante la selectividad y la eficiencia, entonces, la resolución solo depende de $k'/1+k'$, que tiene como valor límite el 1. La resolución entre picos aumenta al aumentar k' ; pero esta disminuye a grandes valores de k' .

Si k' esta entre 0 y 1, la resolución entre los picos es pobre, al igual que al tener valores de k' muy grandes. Estos problemas se pueden solucionar empleando un sistema de gradiente (programación del disolvente) o aumentando la temperatura de la columna.

En el sistema de gradiente la fuerza del solvente se va incrementando conforme pasa el tiempo, con ello los compuestos más retenidos por la columna permanecen menos tiempo en ella y así sus valores de k' disminuyen y por consiguiente la resolución aumenta. La programación del disolvente puede ser lineal, cóncavo o convexo. Al emplear un termostato de columna se disminuye la viscosidad y con ello la presión, se observa menor coileo de los picos; pero usualmente se tiene una menor selectividad.

3.7.6 El análisis cuantitativo en cromatografía.

Se puede llevar a cabo tomando en cuenta alturas o áreas de los picos, se consideran una u otra siempre y cuando la que se elija sea reproducible, especialmente la de la altura. Ambas medidas pueden determinarse con los integradores electrónicos digitales con una buena precisión y exactitud.

Al emplear un estándar interno (E.I.) en HPLC se disminuye el error que se tenga en la manipulación de la muestra; y así se tendrán resultados confiables. El estándar interno tiene que cumplir ciertas características como: su estructura química debe ser semejante a la de los compuestos por analizar, ya que así los tiempos de retención de los analitos y del E.I. estarán cercanos; además, esto permite que en el método de extracción se extraiga cuantitativamente junto con los compuestos por estudiar. Tiene que ser un pico bien definido con una resolución de 1.5.

3.7.7 Métodos analíticos descritos para la cuantificación de metronidazol y sus metabolitos.

En la tabla 1 se presentan los diferentes métodos que se han reportado por Thomsen *y col.* (1995)^[40], Jensen y Gugler (1983)^[41], Nilsson – Ehle *y col.* (1981)^[42], Jessa *y col.* (1996)^[43] y Loft *y col.* (1986)^[44] para cuantificar metronidazol y sus metabolitos. Se observa que en el caso de Nilsson – Ehle *y col.* (1981)^[42] el amortiguador de fosfatos que emplean no da el mejor amortiguamiento a pH = 4. La fase móvil (F.M.) que utilizan Thomsen *y col.*^[40] es de pH =7 lo que indica que no es posible emplearla para detectar el MTZ-COOH. Loft *y col.*^[44] emplean un pH =2.55 en la F.M. el cual está muy cercano al límite de acidez (pH = 2) que puede soportar la columna sin llegar a perder los grupos alquilo. Se puede observar que en los métodos de extracción de: Thomsen *y col.*, Jessa *y col.* y Loft *y col.* (1986) no hacen una extracción propiamente; ya que con los solventes que emplean (los cuales son miscibles en agua) y la metodología que siguen nunca hay separación de fases, lo que implica que nunca llevan a cabo una extracción propiamente, esto lleva a tener un método poco selectivo para los compuestos de interés.

Fase estacionaria	Fase móvil	Compuestos	Extracción	Referencia
LiChrosorb Si 60 (5 µm) a 35°C. (120 x 4.6 mm D.I.)	H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ (200 mM, pH = 7) / CH ₃ OH/H ₂ O; 30/25/45 (v/v/v) y bromuro de N-acetil-N,N,N- trimetil amonio 2.5 mM.	MTZ, MTZ-OH y conjugados. λ = 312 nm	Orina: CH ₃ OH, Centrifugan, diluyen e inyectan	Thomsen y <i>col.</i> 1995 ^[40]
µBondapak C18 (300 x 3.9 mm D.I) 10 µm	H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ (5mM, pH = 4.5) / CH ₃ OH/ THF; 82.6/16.5/0.9 (v/v/v)	MTZ, MTZ-OH, MTZ-COOH. λ = 324 nm	Plasma y orina: CH ₃ CH ₂ OH, ZnSO ₄ Centrifugan e inyectan.	Jensen y Gugler 1983 ^[41] .
Nucleosil C18 (300 x 4 mm D.I.)	H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ (5 mM, pH= 4) / CH ₃ OH/CH ₃ CN, 97/2/1 (v/v/v).	MTZ, MTZ-OH, MTZ-COOH. λ = 320 nm	Plasma y orina: HClO ₄ , CHCl ₃ (no se agrega en plasma). Centrifugan y la fase acuosa la inyectan.	Nilsson – Ehle y <i>col.</i> 1981 ^[43] .
Hypersil ODS 5 µm (150 x 4.6 mm D.I.)	H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ [50 mM, pH= 7 y 0.1% (CH ₃ CH ₂) ₃ N] / CH ₃ CN, 10/90 (v/v).	MTZ y MTZ- OH λ = 317 nm	Plasma, saliva y jugo gastro: HClO ₄ , K ₂ CO ₃ , CH ₃ CN. Centrifugan, evaporan e inyectan	Jessa y <i>col.</i> 1996 ^[43] .
Spherisorb ODS 5 µm (12.5 X 4.6 mm D.I.)	H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ (10 mM, pH= 2.55) CH ₃ OH/CH ₃ CN; 87.5/7.5/5 (v/v/v). (CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂) ₄ N ⁺ HSO ₄ ⁻ (no indican la cantidad)	MTZ, MTZ-OH, MTZ-COOH λ = 320 nm	Plasma: CH ₃ CN Orina: siguen lo descrito por Jensen y Gugler 1983.	Loft y <i>col.</i> 1986 ^[44] .

Tabla 1. Métodos reportados para la cuantificación de metronidazol y sus metabolitos por HPLC.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Equipo:

- ☞ Bomba Waters 510
- ☞ Bomba Waters 515
- ☞ Controlador Gradiente Waters
- ☞ Detector UV/Vis de longitud de onda variable Waters 486
- ☞ Inyector automático Waters TM 717.
- ☞ Software Millennium^{®32} Waters.
- ☞ Columna Symmetry[®] C18 5 μ m, 3.9 mm x 150mm.
- ☞ Equipo de H₂O bidestilada y desionizada Millipore – Q Simplicity 185
- ☞ Filtros de nylon 0.4 μ m de nylon Osmonics.
- ☞ Filtros de 0.2 μ m PVDF Alltech.

4.2. Reactivos.

- ☞ CH₃COONa·3H₂O, Merck.
- ☞ CH₃COOH glacial Merck.
- ☞ CH₃CN grado HPLC, Fisher- Scientific.
- ☞ NaCl para análisis Merck.
- ☞ CH₃CH₂OCH₂CH₃ Merck.
- ☞ CH₂Cl₂ Fisher- Scientific.
- ☞ CH₃COOCH₂CH₃ Sigma.
- ☞ Ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol y 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol (Rhone Poulenc Pharmaceutical Company).
- ☞ 1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (Sigma).
- ☞ 1-[2-(etil sulfonil) etil]-2-metil-5-nitroimidazol (Sigma).

4.3 Metodología.

Todos los solventes empleados en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución fueron filtrados a vacío a través de una membrana 0.4 μm de nylon y colocados en el sonicador.

4.3.1 Disoluciones.

4.3.1.1 Disolución amortiguadora de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0.01M, pH= 4

Se pesó 0.4401g de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{PM}= 136.08$ g/mol, y se transfirió a un matraz volumétrico de 1 litro, fue disuelto con agua desionizada y se le agregó 0.386 mL de CH_3COOH glacial (60.05 g/mol; $\delta=1.05$ g/mL). Se aforó al volumen final con agua desionizada. Las cantidades utilizadas de CH_3COOH y CH_3COONa para esta disolución fueron calculadas con respecto a un pH de 4.4. El pH experimental de la disolución preparada fue de 4.0, probablemente asociado a la ligera acidez del agua desionizada empleada (pH=5.0). Todos los experimentos fueron realizados utilizando esta fase móvil a pH 4.0, a menos que se indique otra cosa.

4.3.1.2 Disolución 0.1 M de CH_3COOH

En un matraz volumétrico de 50 mL se agregó agua bidestilada y 0.286 mL de CH_3COOH glacial y se llevó al volumen final.

Disolución patrón (1mg/mL) de ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol, 1-(2-hidroxiethyl)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol y 1-(2-hidroxiethyl)-2-metil-5-nitroimidazol:

Se pesaron 5 mg de cada estándar y se agregaron 5 mL de agua bidestilada y desionizada. Se hicieron alícuotas y se guardaron a -10°C .

Disolución 1-[2-(etil sulfonil) etil]-2-metil-5-nitroimidazol (E.I) para extracción en orina:

Se pesaron 5 mg de 1-[2-(etil sulfonil) etil]-2-metil-5-nitroimidazol y se le agregó 5 mL de agua bidestilada y desionizada; (disolución 1mg/mL).

En un matraz volumétrico de 10 mL se agregaron 40 μ L de la solución 1mg/mL y se aforó con CH₃CN. Se hicieron alícuotas y se guardaron a -10 °C.

4.3.2 Estandarización de una micro-técnica para la cuantificación de metronidazol y sus dos principales metabolitos en orina.

4.3.2.1 Condiciones cromatográficas.

Todos los sistemas estudiados se evaluaron a partir del factor de selectividad, donde $\alpha > 1.2$ y el factor de capacidad, $2 \leq k' \leq 10$.

Utilizando una columna Symmetry® C18 de 3.9 mm x 150mm con tamaño de partícula de 5 μ m y empleando una longitud de onda a 320nm.

Se empleó un sistema isocrático con amortiguador de H₃PO₄/ H₂PO₄⁻ 0.01M / CH₃CN (90:10, v/v) a pH = 7 y 4. Se obtuvo una mejor separación a pH = 4 por ello para obtener un mejor amortiguamiento en la unidad de pH deseada se empleó el par ácido base de CH₃COOH/CH₃COO⁻ (pka= 4.72) a 0.01M. Se estudió el comportamiento cromatográfico a diferentes pH = 3.3, 3.6, 4, 4.4, 4.61. Para la separación de los tres compuestos y el E.I. se estudiaron diferentes sistemas isocráticos con un flujo de 1 mL/min (Tabla 2).

Al no tener un factor de capacidad: $2 \leq k' \leq 10$ y una selectividad: $\alpha > 1.2$ en los sistemas isocráticos ensayados se estudiaron diversos sistemas de gradiente (Apéndice).

Condición	CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻ 0.01M, pH=4	CH ₃ CN
1	80	20
2	85	15
3	90	10
4	95	5

Tabla 2. Sistemas isocráticos evaluados para la separación de metronidazol, sus metabolitos y E.I..

4.3.2.2 Extracción de MTZ-COOH, MTZ-OH, MTZ y E.I. de la orina.

Se estudiaron diversas extracciones para obtener los tres compuestos y el E.I de manera cuantitativa, así como, selectivamente.

La orina se centrifugó a 3000 r.p.m durante 20 min. y se pasó por un filtro de 0.2 µm PVDF. Tomando en cuenta las propiedades ácido – base de los metabolitos del metronidazol^h se emplearon diversos disolventes: éter, diclorometano, acetato de etilo, acetonitrilo, eter/diclorometano, acetato de etilo/eter.

La extracción con acetonitrilo se estudió a diferente pH= 2, 2.3, 2.9, 4.6, 5.2 y 6.

^h Se formaron las sales con NaOH 0.1 N se eliminaron impurezas con el solvente orgánico, se formó la especie protonada con HCl y se extrajo con solvente orgánico.

4.3.3 Validación del método analítico en orina para la cuantificación de metronidazol y sus dos metabolitos principales.

4.3.3.1 Estándares en solución (F.M.).

A partir de la solución patrón de 1mg/mL de ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol, 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol y 1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol se

hizo la curva de calibración: 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL y 0.5 µg/mL y los controles* : alto = 35 µg/mL, medio = 15µg/mL, y bajo = 1 µg/mL. (Tabla 3)

Concentración (µg/mL)	Solución patrón 1µg/mL (µL)	F.M.⊕ (µL)	Volumen Total (mL)
75	75	925	1
50	50	950	1
*35	35	965	1
25	25	975	1
*15	15	985	1
10	10	990	1
5	10	1990	2
*1	200⊖	800	1
0.5	100⊖	900	1

⊕Este volumen se toma a partir de la solución 5 µg/mL.

⊖F.M.: amortiguador de CH₃COOH/CH₃COO⁻ 0.01M, pH= 4 / CH₃CN (95:5 v/v).

Tabla 3. Curva y controles en solución (F.M.) de metronidazol y sus dos principales metabolitos.

4.3.3.2 Estándares en orina.

De la solución 1mg/mL de metronidazol y metabolitos se preparó la curva de calibración y controles* en orina (Tabla 4).

Concentración (µg/mL)	Solución 1µg/mL (µL)	Orina (µL)	Volumen Total (µL)
75	105	1295	1400
50	70	1330	1400
*35	70	1930	2000
25	35	1365	1400
*15	30	1970	2000
10	14	1386	1400
5	10	1990	2000
*1	400●	1600	2000
0.5	140●	1260	1400

●Este volumen se toma a partir de la solución 5 µg/mL.

Tabla 4. Curva y controles en orina de metronidazol y sus dos principales metabolitos.

4.3.3.3 Parámetros de validación del método¹⁴⁶¹.

Estos criterios se basan en la NORMA Oficial NOM-177-SSA1-1998.

4.3.3.3.1 Linealidad: se construyeron seis curvas en orina en dos días diferentes. Se graficó la respuesta del compuesto: altura del pico del compuesto /altura del pico del E.I. contra cada concentración y se obtuvo la ecuación matemática que describe esta relación para cada compuesto. Para la evaluación de este parámetro se tomaron en cuenta: coeficiente de variación (C.V.) $\leq 15\%$ y un coeficiente de determinación (r^2) ≥ 0.99 .

4.3.3.3.2 Precisión: en este parámetro se evaluó: repetibilidad y reproducibilidad con base en el C.V. $\leq 15\%$.

- a) Repetibilidad (intradía): se analizaron quintuplicados en orina de los tres controles (alto, medio y bajo) en un mismo día.
- b) Reproducibilidad (interdía): el método se evaluó en tres días diferentes, en el día uno y dos se hicieron triplicados de los controles (alto, medio y bajo) y en el día tres cuadruplicados.

4.3.3.3.3 Exactitud: se evaluó con los datos de repetibilidad y reproducibilidad con base en el valor nominal de concentración que debe estar dentro del $\pm 15\%$.

Se calculó con el % de error relativo:

$$\begin{aligned} \text{\% error relativo} &= \frac{\text{error absoluto}}{\text{valor verdadero}} \times 100 \\ &= \frac{X_{\text{exp}} - X_{\text{verd}}}{X_{\text{verd}}} \times 100 \end{aligned}$$

X_{exp} = valor experimental.

X_{verd} = valor verdadero.

4.3.3.3.4 Recobro: se prepararon dos curvas para cada compuesto en solución y en orina. Se graficaron ambas curvas y se obtuvieron las ecuaciones de la recta para cada caso. El porcentaje de recobro se adquirió tomando en cuenta las pendientes de las rectas en solución y en orina.

4.3.3.3.5 Límite de cuantificación: se prepararon quintuplicados de la concentración más baja de la curva ($0.5\mu\text{g}/\text{mL}$) para que el punto tuviera validez el coeficiente de variación debió de ser menor al 20% y el valor promedio de las determinaciones estar dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal.

4.3.3.3.6 Límite de detección: Se evaluó con concentraciones más bajas que el límite de cuantificación y se estableció con la concentración más baja a la cual la altura del compuesto fue tres veces el ruido.

4.3.3.3.7 Estabilidad: se hicieron cuatro curvas en orina, dos se dejaron a temperatura ambiente durante 48 horas y las restantes se procesaron el mismo día y se obtuvo el C.V y la desviación estándar.

Se construyeron en orina seis curvas de metronidazol y sus dos principales metabolitos se analizaron tres en un mismo día, y las tres restantes se dejaron en congelación (-10°C) durante un periodo de 23 días. Las muestras en congelación se compararon con las muestras realizadas ese mismo día. Se obtuvo la recta (promedio de las tres curvas) tanto congelada como sin congelar y se compararon las pendientes.

4.3.4 Estudio del metabolismo del metronidazol en voluntarios, mediante el método analítico establecido.

Cuatro voluntarios informados previamente del estudio y que dieron su consentimiento por escrito para participar en él (Apéndice: C1) se les hicieron tres pruebas clínicas: coproparasitoscópica, funcionamiento renal y funcionamiento hepático.

Al menos una semana antes del estudio y durante el estudio, los individuos no ingirieron alcohol ni tomaron ningún otro medicamento. Se les administró un tratamiento oral de 250 mg de metronidazol cada ocho horas durante tres días, y el medicamento se tomó con 250 mL de agua.

Se recolectó toda la orina de cada voluntario a lo largo del estudio sin dejar ninguna muestra sin analizar. Se les determinó MTZ, MTZ-COOH y MTZ-OH con el método establecido.

Para cada día de análisis de muestras se hizo una curva y duplicado de cada control y se analizaba que cumplieran con los parámetros establecidos en la validación.

El tiempo de muestreo del primer voluntario abarcó 125 horas, el segundo 97.132 horas, el tercero 87.44 horas y el cuarto 99.734 horas. Se empleó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias individuales en las cantidades de los compuestos excretadas en cada día de muestreo.

Para los cuatro voluntarios se obtuvo la concentración, la cantidad excretada y la cantidad excretada acumulada con respecto al tiempo de los tres compuestos; así como la cantidad excretada por día de los compuestos analizados para cada individuo. Estos resultados se graficaron para cada voluntario, se obtuvo el % de cada compuesto excretado con respecto a la concentración de medicamento administrado. Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron para MTZ, MTZ-COOH y MTZ-OH con el programa WinNonlin versión 2.1.

5. RESULTADOS.

5.1. Estadarización de una micro-técnica para la cuantificación de metronidazol y sus dos principales metabolitos en orina.

El gradiente de solventes con el que se logró una separación del metronidazol y sus dos principales metabolitos, así como del E.I. teniendo un valor de $\alpha > 1.2$ y $2 \leq k' \leq 10$ para los cuatro compuestos fue el que se muestra en la tabla 5.

Tiempo (min)	Flujo (mL)	% CH ₃ COOH/CH ₃ CO ⁻	%CH ₃ CN
Inicial	1.0	95	5
5	1.0	95	5
7	1.6	94	6
14	1.6	94	6
15.5	1.6	95	5
17	1.0	95	5

Tabla 5. Gradiente empleado para la separación de MTZ-COOH, MTZ-OH, MTZ y E.I. (TNZ).

En la figura 2 se muestra un cromatograma de los tres compuestos y el E.I. en solución aplicando el gradiente de la tabla 5.

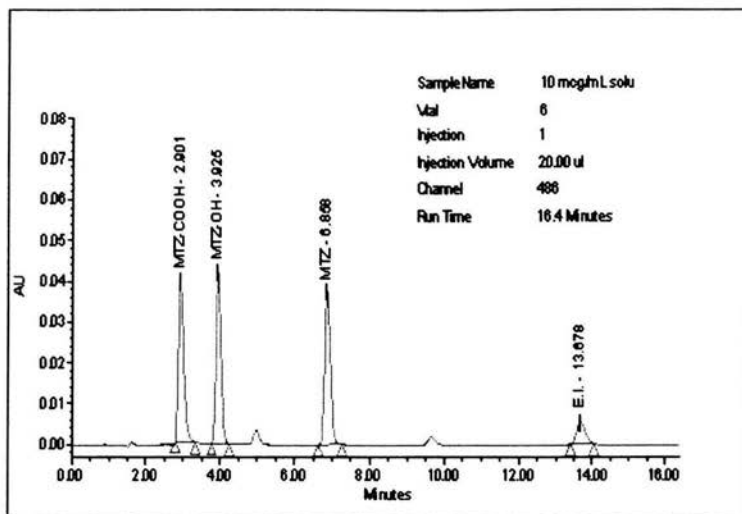
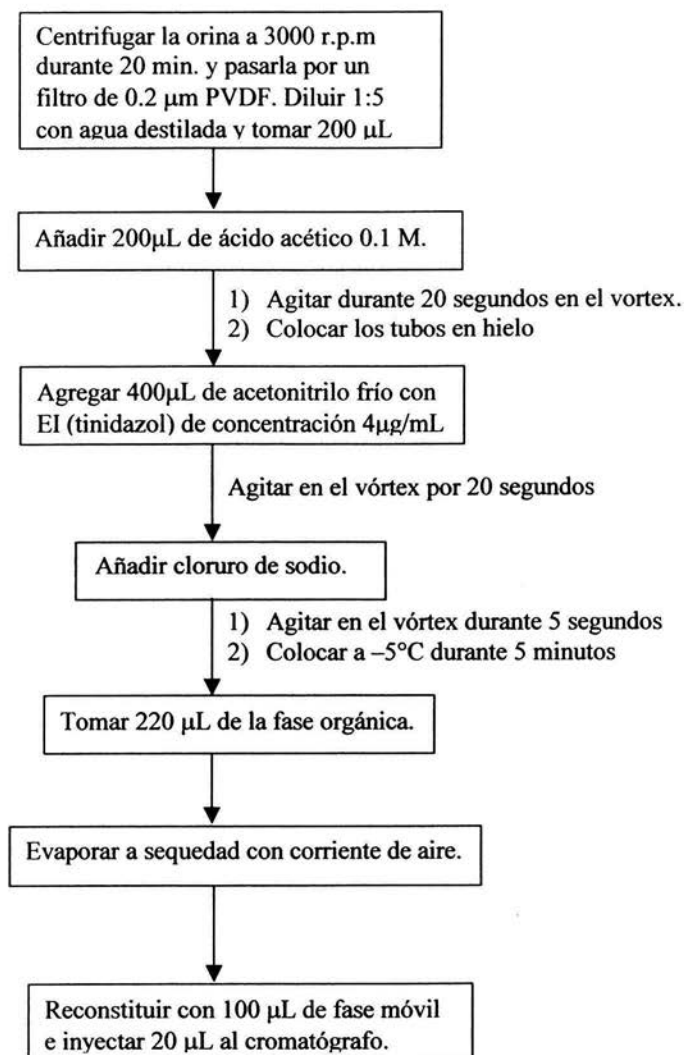


Figura 2. Cromatograma: Separación de metronidazol (MTZ) y sus dos principales metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH) en solución 10µg/mL de cada compuesto.

El tiempo de retención para MTZ-COOH es de 2.9 min., para MTZ-OH es de 3.9 min., para MTZ es de 6.8 min y para E.I. es de 13.6 min. Teniendo así un tiempo de elución para los cuatro compuestos con el gradiente empleado de 16.4 min.

En el esquema 1 se muestra el método de extracción con acetonitrilo y ácido acético que se llegó, para la extracción de MTZ-COOH, MTZ-OH, MTZ y E.I. de manera cuantitativa y selectiva.



Esquema 1. Método de extracción en orina para metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZOH).

Las figuras 3 y 4 se muestran los cromatogramas después de emplear el método de extracción establecido.

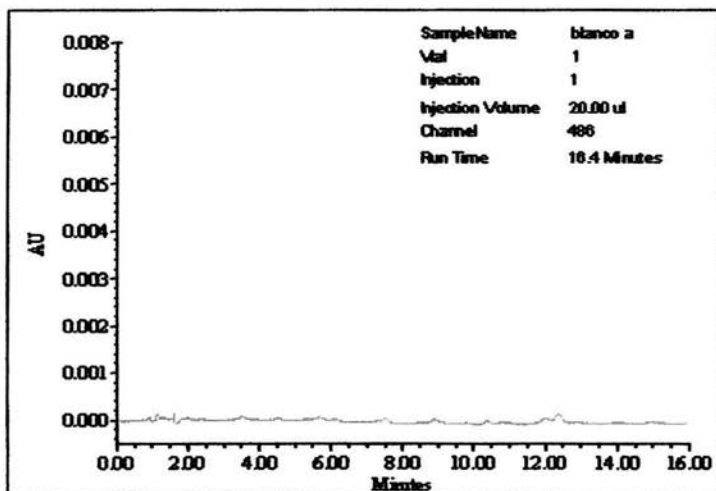


Figura 3. Cromatograma de una extracción de orina sin metronidazol ni sus dos principales metabolitos (blanco de orina).

En la figura 3 se observa que la extracción es selectiva ya que no se encuentra ningún compuesto con el mismos tiempos de retención ni del metronidazol ni de sus dos principales metabolitos; así como tampoco del E.I.

A orina blanco se le adicionó MTZ, MTZ-COOH y MTZ-OH a esta orina con concentración final de 25 $\mu\text{g/mL}$ se le hizo la extracción y se inyectó en el cromatógrafo (figura 4).

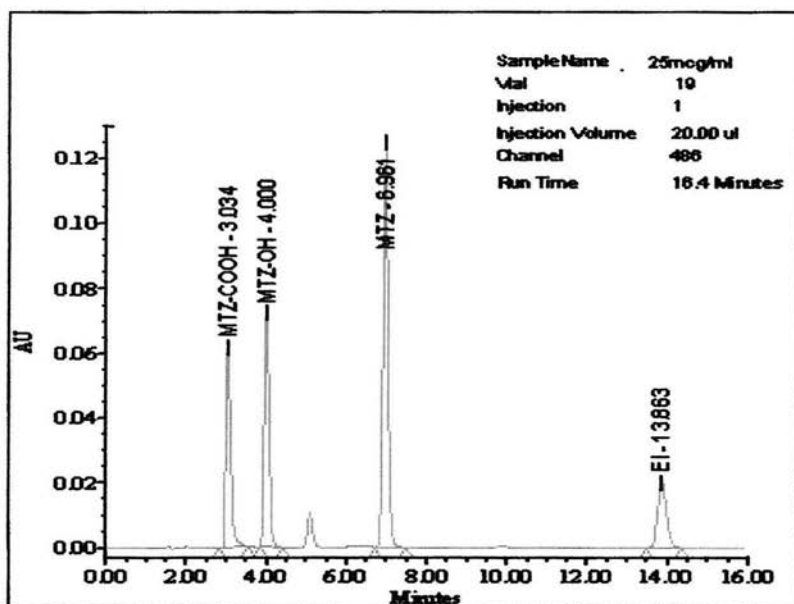


Figura 4. Cromatograma de orina adicionada con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno de los compuestos: metronidazol (MTZ), el metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH) y el hidroxilado (MTZ-OH).

5.2 Validación del método analítico en orina para la cuantificación de metronidazol y sus dos metabolitos principales.

5.2.1 LINEALIDAD.

Se consideraron dos factores para definir este parámetro: Coeficiente de determinación: $r^2 \geq 0.99$ y coeficiente de variación (C.V.) $< 15\%$.

Los valores registrados en las tablas 6, 7 y 8 muestran las respuestas obtenidas para las concentración de cada uno de los compuestos (MTZ-COOH tabla 6, MTZ-OH tabla 7 y MTZ tabla 8) realizadas en dos días.

Compuesto: MTZ-COOH

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (Altura MTZ-COOH/ Altura E.I.)						Promedio	Desviación estándar	C.V. (%)
	Curva 1 [▲]	Curva 2 [▲]	Curva 3 [▲]	Curva 4 [■]	Curva 5 [■]	Curva 6 [■]			
0.5	0.077252	0.077419	0.083565	0.063616	0.078177	0.062005	0.074	0.009	11.868
5	0.735684	0.703168	0.688193	0.655571	0.652441	0.655231	0.682	0.034	4.934
10	1.580566	1.652126	1.67728	1.409271	1.269788	1.363666	1.492	0.168	11.235
25	3.615479	3.553016	3.626232	3.078962	3.096514	3.364226	3.389	0.252	7.427
50	6.917735	6.924348	6.861968	6.099061	6.539848	5.952642	6.549	0.432	6.596
75	10.19277	9.871134	9.736752	8.744793	8.465172	8.484517	9.249	0.771	8.331

Tabla 6. Linealidad del método para el metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH).

Compuesto: MTZ-OH

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (Altura MTZ-OH/ Altura E.I.)						Promedio	Desviación estándar	C.V. (%)
	Curva 1 [▲]	Curva 2 [▲]	Curva 3 [▲]	Curva 4 [■]	Curva 5 [■]	Curva 6 [■]			
0.5	0.080551	0.079045	0.086284	0.078063	0.107647	0.07676	0.085	0.012	13.819
5	0.735653	0.760397	0.784244	0.751226	0.757337	0.751141	0.757	0.016	2.112
10	1.63909	1.667715	1.61984	1.553417	1.547619	1.567538	1.599	0.050	3.123
25	3.681654	3.777793	3.776933	3.602742	3.483654	3.786636	3.685	0.122	3.317
50	7.906424	7.868816	7.650676	6.940659	7.309846	7.080977	7.460	0.410	5.490
75	10.86385	11.490239	11.70535	10.810931	10.292126	10.29724	10.910	0.590	5.405

Tabla 7. Linealidad del método para el metabolito hiroxilado del metronidazol (MTZ-OH).

Compuesto: MTZ

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (Altura MTZ/ Altura E.I.)						Promedio	Desviación estándar	C.V. (%)
	Curva 1 [▲]	Curva 2 [▲]	Curva 3 [▲]	Curva 4 [■]	Curva 5 [■]	Curva 6 [■]			
0.5	0.121953	0.120547	0.121511	0.125888	0.167126	0.127868	0.131	0.018	13.768
5	1.134256	1.137629	1.12258	1.216304	1.35275	1.272208	1.206	0.093	7.672
10	2.407665	2.445818	2.544625	2.713182	2.676646	2.573024	2.560	0.121	4.743
25	5.617147	5.855268	5.810442	5.707571	6.34161	6.185259	5.920	0.283	4.785
50	11.392176	11.673766	11.427465	11.153015	12.323263	11.531051	11.583	0.401	3.463
75	16.801255	17.280154	17.651887	17.543712	18.217031	17.021415	17.419	0.503	2.888

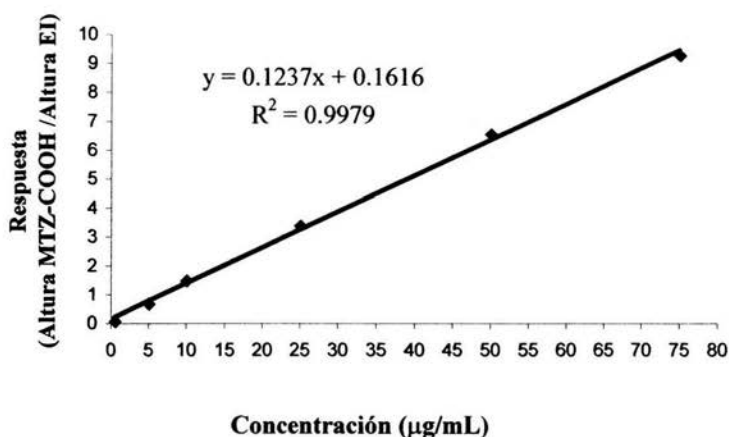
Tabla 8. Linealidad del método para el metronidazol (MTZ).

▲Curvas realizadas en el día uno. ■Curvas realizadas en el día dos.

Resultados

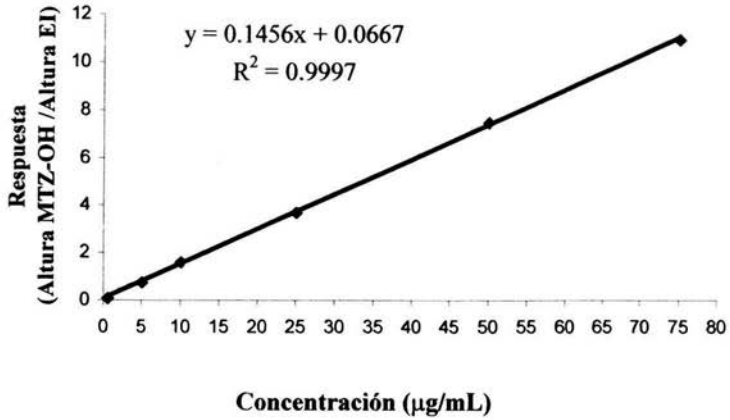
En las tablas anteriores (6, 7 y 8) se observa que la desviación estándar obtenida en las seis curvas de cada compuesto es inferior a 0.78 y el coeficiente de variación mantiene valores dentro de los parámetros establecidos para definir la linealidad del método. Para demostrar su comportamiento lineal se construyó una gráfica para cada compuesto considerando los valores señalados en estas tablas.

En las siguientes gráficas (1,2 y 3) se presenta la linealidad del método en orina para cada uno de los tres compuestos (MTZ-COOH, MTZOH y MTZ) empleando el promedio de respuesta (altura del compuesto / altura EI) de las seis curvas hechas en dos días.



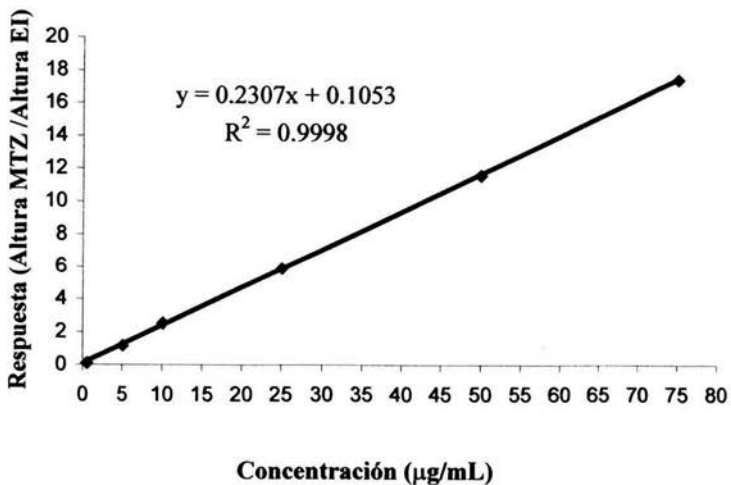
Gráfica 1. Linealidad del método en orina para el metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH).

La gráfica 1 muestra el método de extracción en orina del compuesto MTZ-COOH en el intervalo de concentraciones de 0.5 µg/mL -75 µg/mL.



Gráfica 2. Linealidad del método en orina para el metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH).

En la gráfica 2 se observa la correlación entre las diferentes concentraciones del compuesto MTZ-OH y su respuesta en el intervalo establecido (0.5 µg/mL -75 µg/mL).



Gráfica 3. Linealidad del método en orina para el metronidazol (MTZ).

De igual manera que lo observado en las gráficas 1 y 2, en la gráfica 3, muestra el resultado de la linealidad del método (relación entre concentración y respuesta) a lo largo del rango establecido para el compuesto MTZ.

5.2.2. REPETIBILIDAD

En la tabla 9 (MTZ-COOH), 10 (MTZ-OH) y 11 (MTZ) se muestran, para un mismo día, la repetibilidad: precisión y exactitud del método en orina, empleando quintuplicados del control bajo ($1\mu\text{g/mL}$), medio ($5\mu\text{g/mL}$) y alto ($35\mu\text{g/mL}$).

Para obtener las concentraciones de cada control (bajo, medio y alto) se hizo una interpolación de las respuestas (altura del compuesto / altura E.I.) en la curva de calibración inyectada ese mismo día, la cual cumplió con los criterios establecidos en la linealidad del método.

En la tabla 9 se muestra que el coeficiente de variación (C.V.) en los quintuplicados de los tres controles del compuesto MTZ-COOH, es menor al 6% y el valor nominal de cada concentración tiene un error menor al $\pm 6\%$.

Compuesto: MTZ-COOH

	Concentración 1 µg/mL control bajo	Concentración 5 µg/mL control medio	Concentración 35 µg/mL control alto
1° Repetición	0.96	13.653	36.584
2° Repetición	0.895	13.301	32.083
3° Repetición	1.004	15.111	36.23
4° Repetición	0.88	13.71	33.169
5° Repetición	0.963	14.726	33.721
Promedio	0.9404	14.100	34.357
Desviación Estándar	0.052	0.775	1.966
C.V. (%)	5.487	5.498	5.721
% error relativo	-5.960	-5.999	-1.836
% Exactitud	94.040	94.001	98.164

Tabla 9 Repetibilidad: precisión y exactitud del método para el metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH).

Compuesto: MTZ-OH

	Concentración 1 µg/mL control bajo	Concentración 5 µg/mL control medio	Concentración 35 µg/mL control alto
1° Repetición	0.892	13.949	34.403
2° Repetición	0.938	13.856	33.865
3° Repetición	0.949	14.625	35.839
4° Repetición	0.927	14.699	33.588
5° Repetición	0.926	15.479	34.313
Promedio	0.9264	14.522	34.402
Desviación Estándar	0.021	0.658	0.869
C.V. (%)	2.308	4.528	2.527
% error relativo	-7.360	-3.189	-1.710
%Exactitud	92.640	96.811	98.290

Tabla 10. Repetibilidad: precisión y exactitud del método para el metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH).

De la tabla 10 obtenemos que el promedio de las cinco réplicas tiene un coeficiente de variación (C.V.) menor al 4.6 % para los tres controles y un error menor a ± 7.4 % del valor nominal en cada concentración del compuesto MTZ-OH.

Compuesto: MTZ

	Concentración 1µg/mL control bajo	Concentración 5 µg/mL control medio	Concentración 35 µg/mL control alto
1º Repetición	1.004	14.768	37.138
2º Repetición	1.014	14.271	33.956
3º Repetición	1.021	14.999	35.567
4º Repetición	1.02	14.145	37.227
5º Repetición	0.979	13.967	35.86
Promedio	1.0076	14.430	35.950
Desviación Estándar	0.017	0.436	1.339
C.V. (%)	1.723	3.018	3.725
% error relativo	0.760	-3.800	2.713
%Exactitud	100.760	96.200	102.713

Tabla 11. Repetibilidad, precisión y exactitud del método para el metronidazol (MTZ).

En la tabla 11 los datos demuestran la repetibilidad del método evaluada como precisión (C.V. de 3.7 %) y exactitud (96.2 % - 102.7%) en los quintuplicados de los tres controles del compuesto: MTZ. El valor nominal de cada concentración es menor al $\pm 3.9\%$, en los tres controles: alto, medio y bajo.

5.2.3 REPRODUCIBILIDAD

En las tablas 12, 13y 14 se presenta la reproducibilidad: precisión y exactitud del método con los controles: bajo (1 µg/mL), medio (5 µg/mL) y alto (35 µg/mL) en tres diferentes días; para el día 1 y 2 son triplicados y para el día 3 son cuadruplicados.

Compuesto: MTZ-COOH

	Concentración 1 µg/mL control bajo	Concentración 5 µg/mL control medio	Concentración 35 µg/mL control alto
DÍA 1	1.162	14.574	32.924
	0.924	14.131	33.082
	0.968	14.396	31.924
DÍA 2	1.034	14.053	33.552
	0.997	14.567	35.108
	0.986	14.48	37.487
DÍA 3	0.962	14.4	39.315
	0.93	15.22	39.772
	1.019	15.206	35.921
	1.018	15.215	37.727
Promedio	1	14.624	35.681
Desviación Estándar	0.068	0.440	2.804
C.V. (%)	6.785	3.007	7.859
% error relativo	0.000	-2.505	1.946
%Exactitud	100.000	97.495	101.946

Tabla 12. Reproducibilidad: precisión y exactitud del método para el metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH).

Resultados

La tabla 12 muestra las concentraciones de cada control del compuesto MTZ-COOH, en tres días, teniendo un C.V % menor del 8% y un error menor del ± 2.6 % del valor nominal en cada concentración.

Compuesto: MTZ-OH

	Concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ control bajo	Concentración 5 $\mu\text{g/mL}$ control medio	Concentración 35 $\mu\text{g/mL}$ control alto
DÍA 1	1.19	15.857	34.819
	0.896	14.764	34.315
	1.03	15.355	32.639
DÍA 2	1.018	14.829	37.926
	1.122	14.19	38.791
	1.01	15.119	34.627
DÍA 3	1.042	15.047	34.109
	0.952	15.785	36.536
	1.008	15.684	34.116
	0.959	15.022	37.187
Promedio	1.023	15.165	35.507
Desviación Estándar	0.084	0.520	1.980
C.V. (%)	8.232	3.426	5.578
% error relativo	2.270	1.101	1.447
%Exactitud	102.270	101.101	101.447

Tabla 13. Reproducibilidad, precisión y exactitud del método para el metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH).

En la tabla 13 se observa que en los tres días en los que se cuantificaron los tres controles del compuesto MTZ-OH no hubo diferencias significativas entre días; ya que se tuvo un C.V. % menor al 8.3 % y un error menor del ± 2.4 % del valor nominal en cada concentración.

Compuesto: MTZ

	Concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ control bajo	Concentración 5 $\mu\text{g/mL}$ control medio	Concentración 35 $\mu\text{g/mL}$ control alto
DÍA 1	1.229	15.635	34.441
	0.95	14.742	34.826
	0.976	15.085	33.363
DÍA 2	1.072	14.053	35.157
	1.123	14.829	36.592
	1.007	15.09	32.111
DÍA 3	0.997	14.877	32.961
	0.918	15.541	34.913
	0.989	15.278	34.586
	0.892	14.993	37.187
Promedio	1.015	15.012	34.614
Desviación Estándar	0.101	0.447	1.548
C.V. (%)	9.961	2.975	4.471
% error relativo	1.530	0.082	-1.104
%Exactitud	101.530	100.082	98.896

Tabla 14. Reproducibilidad, precisión y exactitud del método para el metronidazol (MTZ).

El compuesto: MTZ en el promedio de los tres días tiene un CV % menor al 10 % y un error menor del ± 1.6 % del valor nominal de cada concentración, por lo que, el método tiene un % de exactitud muy cercano al 100%.

5.2.4 RECOBRO.

En la Tabla 15 se exponen los resultados del promedio del porcentaje de recobro tomando en cuenta las pendientes de las rectas en solución y en orina para cada uno de los tres compuestos.

Compuesto	% Recobro
MTZ-COOH	69
MTZ-OH	75
MTZ	99

Tabla 15. Porcentaje de recobro de los dos metabolitos del metronidazol: ácido acético (MTZ-COOH) hidroxilado (MTZ-OH), así como del metronidazol (MTZ).

5.2.5 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN.

En la tablas 16 se presentan los quintuplicados de MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ de la concentración más baja de la curva, para el límite de cuantificación del método en orina.

Compuestos: MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ.

	MTZ-COOH Concentración 0.5 µg/mL	MTZ-OH Concentración 0.5 µg/mL	MTZ Concentración 0.5 µg/mL
1° Repetición	0.503	0.496	0.482
2° Repetición	0.456	0.474	0.443
3° Repetición	0.496	0.516	0.488
4° Repetición	0.601	0.484	0.448
5° Repetición	0.503	0.508	0.497
Promedio	0.512	0.496	0.472
Desviación estándar	0.054	0.017	0.024
C.V. (%)	10.465	3.453	5.191
%error relativo	2.36	-0.880	-5.680
% Exactitud	97.64	99.12	94.32

Tabla 16. Limite de cuantificación, 0.5µg/mL, de los compuesto: ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH), metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH) y el metronidazol (MTZ).

En la tabla 16 se observa que la concentración de 0.5 µg/mL para MTZ-COOH tiene un coeficiente de variación de 10.5 % y el porcentaje de error para el valor nominal es de ± 5.7 %. El MTZ-OH, tiene un coeficiente de variación no mayor al 3.6 % y un error en el valor nominal de ± 0.9 %. El coeficiente de variación que se obtiene en MTZ es de 5.2 % y se observa que el valor nominal presenta un error del ± 5.7 %.

5.2.6 LIMITE DE DETECCIÓN.

La concentración más baja que se pudo detectar en el cromatograma (que fue tres veces la altura del ruido) fue para MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ de 0.05 µg/mL.

5.2.7 ESTABILIDAD

En la tabla 17 (MTZ-COOH), 18 (MTZ-OH) y 19 (MTZ) se muestran los duplicados de las curvas que estuvieron por 48 horas a temperatura ambiente.

Compuesto: MTZ-COOH.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (Altura MTZ-COOH /altura E.I.)		Promedios	Desviación estándar	C.V.
	Curva 1	Curva 2			
0.5	0.0388	0.0413	0.0401	0.0018	4.4572
10	0.9135	0.8617	0.8876	0.0366	4.1281
25	1.8071	2.3273	2.0672	0.3678	17.7944
50	4.8412	4.3949	4.6180	0.3156	6.8341
75	6.2387	6.5855	6.4121	0.2452	3.8245

Tabla 17. Estabilidad a 48 horas a temperatura ambiente del metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH).

Compuesto: MTZ-OH.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (Altura MTZ-OH /altura E.I.)		Promedios	Desviación estándar	C.V.
	Curva 1	Curva 2			
0.5	0.0694	0.0721	0.0707	0.0020	2.7651
10	1.5600	1.6337	1.5968	0.0521	3.2649
25	4.3528	4.1782	4.2655	0.1235	2.8957
50	8.3832	8.5133	8.4482	0.0920	1.0886
75	12.7699	11.8019	12.2859	0.6845	5.5711

Tabla 18. Estabilidad a 48 horas a temperatura ambiente del metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH).

Compuesto: MTZ.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (Altura MTZ-OH /altura E.I.)		Promedios	Desviación estándar	C.V.
	Curva 1	Curva 2			
0.5	0.1057	0.1108	0.1083	0.0036	3.3317
10	2.4321	2.4115	2.4218	0.0145	0.6003
25	6.1765	6.0786	6.1276	0.0692	1.1298
50	12.8281	12.2021	12.5151	0.4427	3.5371
75	18.0435	16.8790	17.4613	0.8234	4.7155

Tabla 19. Estabilidad a 48 horas a temperatura ambiente del metronidazol (MTZ).

La estabilidad de los compuestos MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ en congelación durante 23 se muestran en las tablas 20, 21 y 22 respectivamente.

Compuesto: MTZ-COOH.

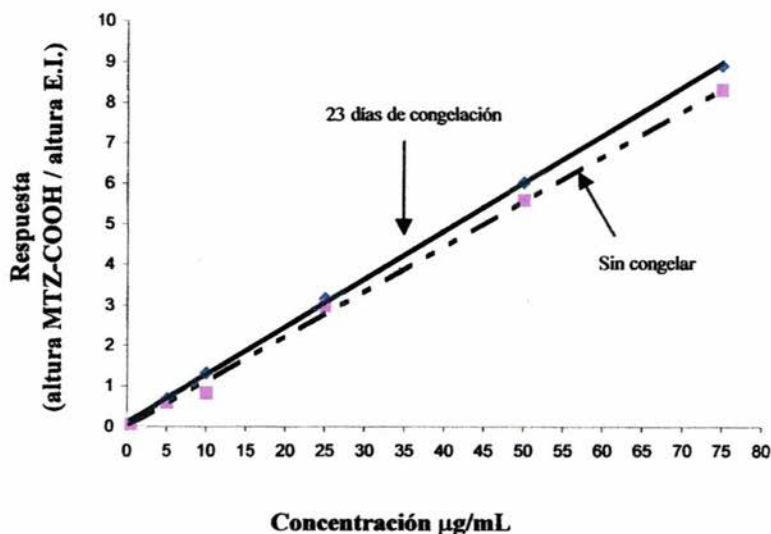
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (altura MTZ-COOH/ altura E.I.)			Promedio	Desviación estándar	C.V. (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0.5	0.0633	0.0570	0.0587	0.0596	0.0033	5.5218
5	0.7015	0.6812	0.6878	0.6902	0.0104	1.5047
10	1.2711	1.3837	1.2974	1.3174	0.0589	4.4739
25	3.2157	3.2103	3.0416	3.1559	0.0990	3.1375
50	5.8766	5.7823	6.3633	6.0074	0.3118	5.1908
75	8.9549	8.8067	8.9308	8.8975	0.0795	0.8937

Tabla 20 Estabilidad a 23 días de congelación del metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH).

Resultados

El coeficiente de variación del promedio de las tres curvas es menor al 5.6%, no hay una variación significativa entre cada medición.

En las siguientes gráficas: 4, 5 y 6 se muestra el promedio de respuesta (altura compuesto/altura E.I.) de los triplicados de la curvas de MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ en orina congeladas durante 23 días comparada con el promedio de las tres curvas hechas ese mismo día.



Gráfica 4. Estabilidad del metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH) a 23 días de congelación comparado con el no congelado (realizado ese día).

La ecuación de la recta para el compuesto MTZ-COOH sin congelar fue de $y = 0.1117x - 0.0283$, con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9978; y a 23 días de congelado $y = 0.1179x + 0.1035$, $r^2 = 0.9996$ (gráfica 4).

Resultados

Para el compuesto MTZ-OH a lo largo del rango de 0.5µg/mL - 75µg/mL el coeficiente de variación no fue mayor a 6.2 % (tabla 21).

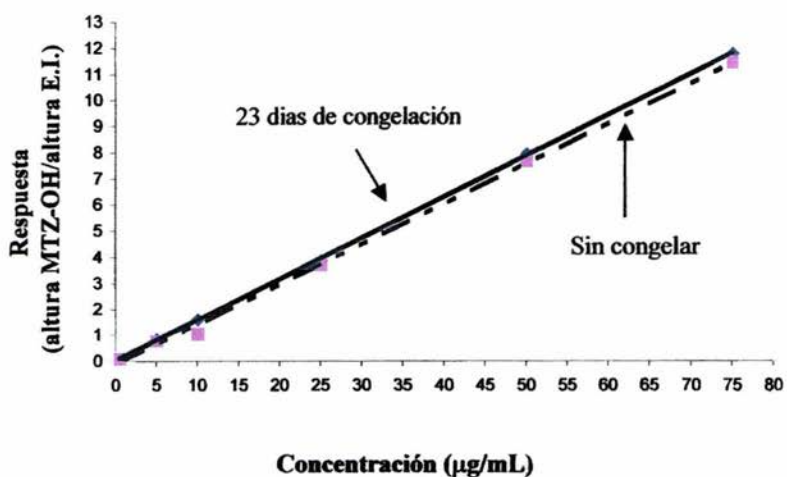
Las concentraciones de la recta realizadas el mismo día su ecuación fue: $y = 0.1543x - 0.1531$, coeficiente de determinación, r^2 , 0.9983 y las congeladas (23 días) $y = 0.1568x + 0.0155$ y r^2 de 0.9999 (gráfica 5).

El valor de las pendientes de las dos rectas (congelada y procesada el mismo día) varía en dos milésimas y el coeficiente de determinación es significativo (gráfica 5).

Compuesto: MTZ-OH.

Concentración (µg/mL)	Respuesta (altura MTZ-OH/altura E.I.)			Promedio	Desviación estándar	C.V. (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0.5	0.0746	0.0751	0.0819	0.0785	0.0048	6.1101
5	0.8649	0.8732	0.8134	0.8433	0.0423	5.0171
10	1.6076	1.5640	1.6125	1.5882	0.0343	2.1595
25	4.0301	3.8048	3.9062	3.8555	0.0717	1.8607
50	7.8302	7.3372	8.5091	7.9231	0.8286	10.4582
75	11.3500	11.8931	11.6091	11.7511	0.2008	1.7085

Tabla 21. Estabilidad a 23 días de congelación del metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH):

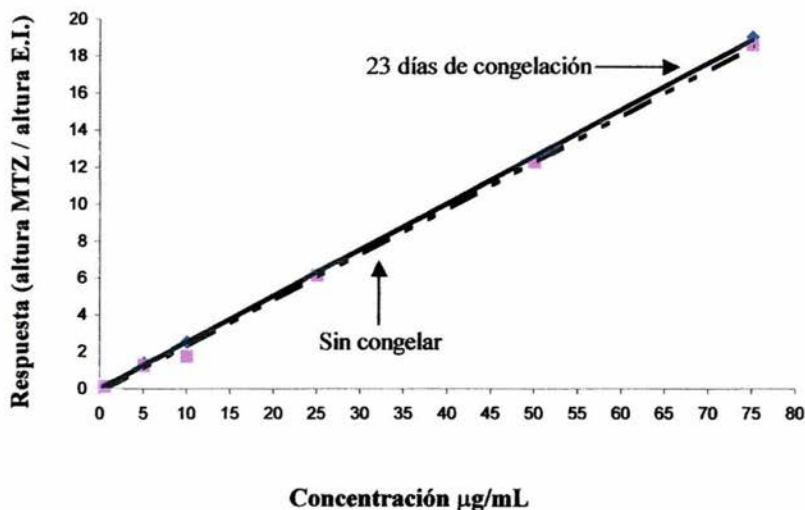


Gráfica 5. Estabilidad a: 23 días de congelación del metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH) comparada con la curva sin congelar.

Compuesto: MTZ.

Concentración (µg/mL)	Respuesta (altura MTZ /altura E.I.)			Promedio	Desviación estándar	C.V. (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0.5	0.1202	0.1268	0.1305	0.1258	0.0052	4.1683
5	1.3757	1.3586	1.3503	1.3615	0.0129	0.9498
10	2.4917	2.5825	2.4673	2.5138	0.0607	2.4150
25	6.0595	6.2817	6.1085	6.1499	0.1167	1.8978
50	12.0038	11.9625	12.9885	12.3183	0.5808	4.7152
75	18.7765	19.3292	18.9436	19.0164	0.2835	1.4906

Tabla 22. Estabilidad del metronidazol (MTZ) a 23 días de congelación.



Gráfica 6. Estabilidad del metronidazol (MTZ) a 23 días de congelación y la curva procesada el mismo día.

La ecuación de la recta para la curva realizada sin someterse a congelación fue: $y = 0.2496x - 0.2165$ con r^2 de 0.9984 y en el caso de la recta congelada fue: $y = 0.2514x - 0.0202$ y r^2 de 0.9996.

5.3 ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL METRONIDAZOL EN CUATRO VOLUNTARIOS MEDIANTE EL MÉTODO ANALÍTICO ESTABLECIDO.

En la Tabla 23 se muestran los datos de los cuatro voluntarios que participaron en el estudio.

Voluntarios	1	2	3	4
Sexo	Masculino	Femenino	Masculino	Masculino
Edad (años)	26	36	43	23
Peso (Kg)	90	71.6	78.4	69.46
Talla (m)	1.80	1.59	1.75	1.67
Parásito	Negativo	<i>Entamoeba Coli</i>	<i>Blastocystis hominis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>
Creatinina sérica (mg/dL)	1.0	0.6	1.0	1.0
AST (IU/L)	18	24	28	17
ALT (IU/L)	20	23	25	13
TBIL (mg/dL)	0.8	0.7	0.9	0.9
DBIL (mg/dL)	0.1	0.1	0.1	0.2
LD (IU/L)	137	116	144	149

Creatinina sérica : Rango de referencia: 0.5-1.5 mg/dL.

AST: Transaminasa: aspartato aminotransferasa. Rango de referencia: 5-42 IU/L.

ALT: Transaminasa: alaninoaminotransferasa. Rango de referencia: 10-60 IU/L.

TBIL: Bilirrubinas totales. Rango de referencia: 0.5-1.5 mg/dL.

DBIL: Bilirrubina directa. Rango de referencia: 0.0-0.5 mg/dL.

LD: Lactato deshidrogenasa. Rango de referencia: 90-180 IU/L.

Tabla 23. Datos de los 4 pacientes que participaron en el estudio de metronidazol con una dosis de 250 mg cada ocho horas durante 3 días.

En la tabla 24 y 25 se muestran los resultados de la excreción del metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH) en el voluntario 1, durante el tiempo de muestreo.

Tiempo de muestreo (horas)	Volumen de orina (mL)	Concentración MTZ-COOH ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración MTZ-OH ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración MTZ ($\mu\text{g/mL}$)
0	205	0	0	0
2	495	10.700	8.155	11.825
4	104	4.705	17.850	16.170
5	957	4.500	8.455	6.120
6	115	2.185	30.255	15.680
7	56	2.510	35.070	16.280
8	190	5.900	12.685	5.980
10	1310	5.900	15.075	13.915
12	300	23.420	32.585	21.125
14	260	11.935	41.435	14.830
22	426	56.235	85.505	36.735
24	435	42.405	39.470	27.735
27	908	19.440	23.700	17.305
30	275	45.955	82.430	28.280
33	360	46.920	74.550	43.760
36	319.9	45.800	83.090	32.880
38	142	56.845	108.380	33.315
46	261	114.040	172.385	53.780
48	145	66.210	66.765	42.920
53.5	1000	30.900	66.530	34.625
60	962	36.000	49.015	25.310
62	190	66.065	77.585	22.110
70	818	29.475	75.850	25.395
74	258	50.000	96.265	30.390
79	664	12.765	75.080	17.400
86	670	12.150	48.580	5.635
96	655	10.940	49.665	5.745
106	990	0.545	26.710	0.410
122	860	NC	10.205	NC
125	275	NC	7.380	NC

Tabla 24 Concentración en orina de metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH), en el voluntario 1.

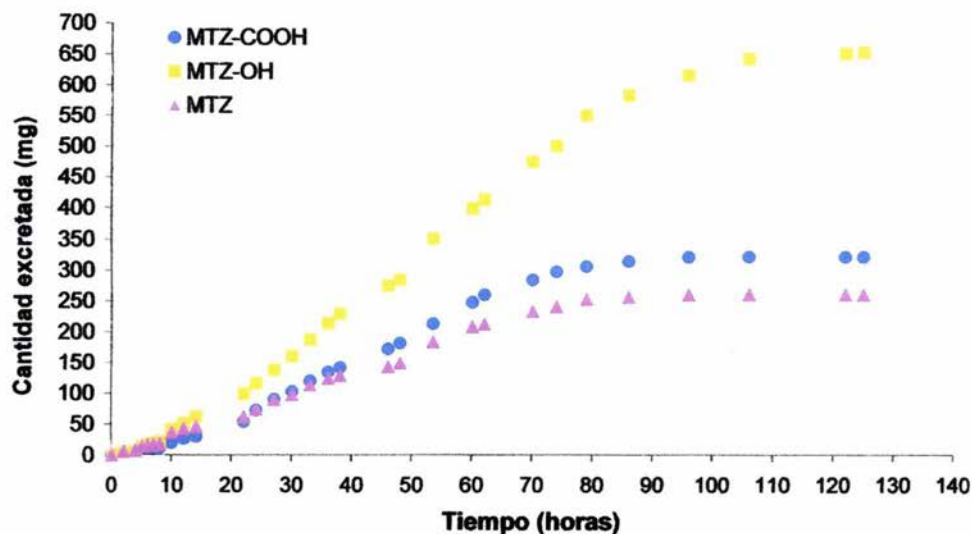
Resultados

Tiempo de muestreo (horas)	Cantidad excretada de MTZ-COOH (mg)	Cantidad excretada de MTZ-OH (mg)	Cantidad excretada de MTZ (mg)	Cantidad acumulada excretada de MTZ-COOH (mg)	Cantidad acumulada excretada de MTZ-OH (mg)	Cantidad acumulada excretada de MTZ (mg)
2	5.2965	4.0367	5.8534	5.2965	4.0367	5.8534
4	0.4893	1.8564	1.6817	5.7858	5.8931	7.5351
5	4.3065	8.0914	5.8568	10.0923	13.9845	13.3919
6	0.2513	3.4793	1.8032	10.3436	17.4638	15.1951
7	0.1406	1.9639	0.9117	10.4842	19.4277	16.1068
8	1.1210	2.4102	1.1362	11.6052	21.8379	17.2430
10	7.7290	19.7483	18.2287	19.3342	41.5862	35.4717
12	7.0260	9.7755	6.3375	26.3602	51.3617	41.8092
14	3.1031	10.7731	3.8558	29.4633	62.1348	45.6650
22	23.9561	36.4251	15.6491	53.4194	98.5599	61.3141
24	18.4462	17.1695	12.0647	71.8656	115.7294	73.3788
27	17.6515	21.5196	15.7129	89.5171	137.2490	89.0917
30	12.6376	22.6683	7.7770	102.1547	159.9173	96.8687
33	16.8912	26.8380	15.7536	119.0459	186.7553	112.6223
36	14.6514	26.5805	10.5183	133.6973	213.3358	123.1406
38	8.0720	15.3900	4.7307	141.7693	228.7258	127.8713
46	29.7644	44.9925	14.0366	171.5337	273.7183	141.9079
48	9.6005	9.6809	6.2234	181.1342	283.3992	148.1313
53.5	30.9000	66.5300	34.6250	212.0342	349.9292	182.7563
60	34.6320	47.1524	24.3482	246.6662	397.0816	207.1045
62	12.5524	14.7412	4.2009	259.2186	411.8228	211.3054
70	24.1106	62.0453	20.7731	283.3292	473.8681	232.0785
74	12.9000	24.8364	7.8406	296.2292	498.7045	239.9191
79	8.4760	49.8531	11.5536	304.7052	548.5576	251.4727
86	8.1405	32.5486	3.7755	312.8457	581.1062	255.2482
96	7.1657	32.5306	3.7630	320.0114	613.6368	259.0112
106	0.5396	26.4429	0.4059	320.5510	640.0797	259.4171
122	NC	8.7763	NC	320.5510	648.8560	259.4171
125	NC	2.0295	NC	320.5510	650.8855	259.4171

Tabla 25. Cantidad excretada y cantidad excretada acumulada de (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH), en el voluntario 1.

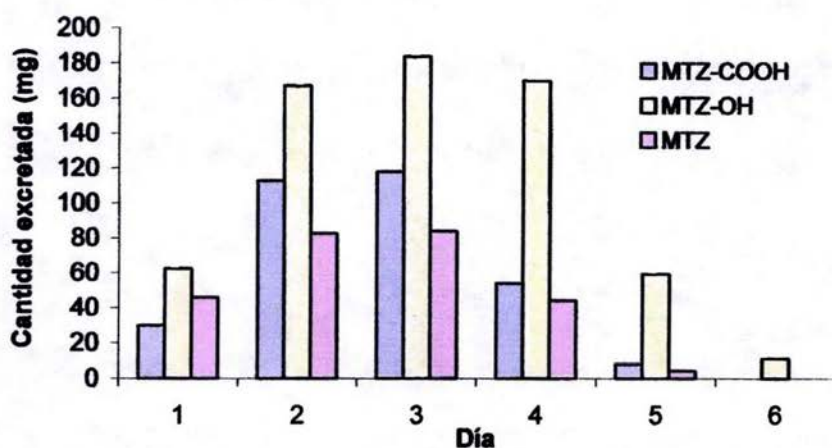
En la tabla 24 y 25 se observa que a las 122 horas de muestreo ya no hay presencia en el fluido urinario del compuesto MTZ-COOH ni del MTZ.

En la Gráfica 7 se muestran los resultados de las cantidades excretadas acumuladas del metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH) hasta las 125 horas para el voluntario 1.



Gráfica 7. Cantidad excretada acumulada del metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH), metabolito hidroxilado (MTZ-OH) y metronidazol (MTZ) en función del tiempo, en el voluntario 1.

En la Gráfica 8 se muestran los 6 días de muestreo en el voluntario 1. La cantidad que metabolizó en ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH), en el metabolito hidroxilado (MTZ-OH) y la del fármaco inalterado (MTZ)



Gráfica 8. Cantidad excretada de metronidazol (MTZ) y su dos metabolitos principales (MTZ-COOH y MTZ-OH) en cada día de muestreo. Voluntario 1.

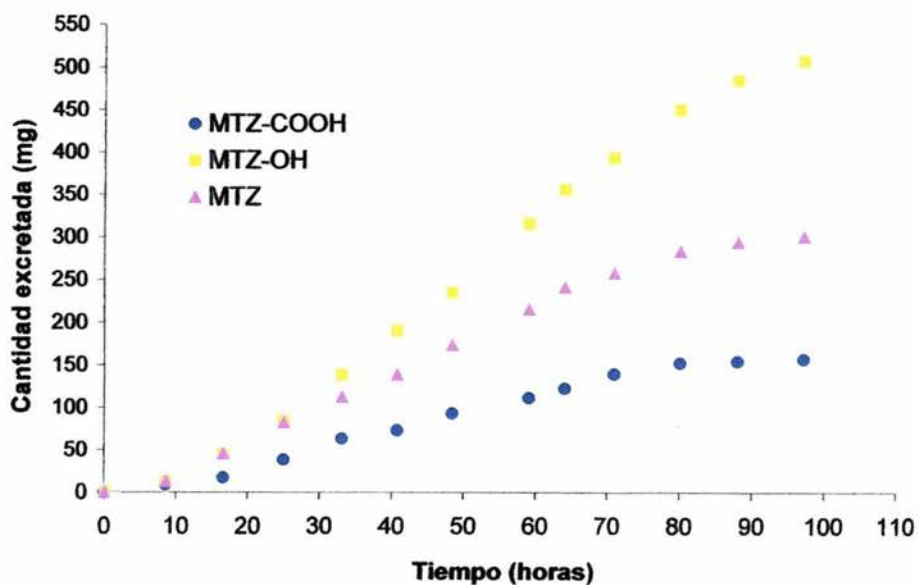
Resultados

En la tabla 26 se muestran los resultados de la excreción del metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH) en el voluntario 2, durante el tiempo de muestreo.

Tiempo de muestreo (horas)	Concentración MTZ-COOH (µg/mL)	Concentración MTZ-OH (µg/mL)	Concentración MTZ (µg/mL)	Volumen de orina (mL)	Cantidad excretada MTZ-COOH (mg)	Cantidad excretada MTZ-OH (mg)	Cantidad excretada MTZ (mg)	Cantidad excretada acumulada MTZ-COOH (mg)	Cantidad excretada acumulada MTZ-OH (mg)	Cantidad excretada acumulada MTZ (mg)
8.533	33.405	46.510	50.055	265	8.8523	12.3252	13.2646	8.8523	12.3252	13.2646
16.535	18.815	75.435	74.705	431	8.1093	32.5125	32.1979	16.9616	44.8376	45.4624
24.918	36.915	69.125	64.560	570	21.0416	39.4013	36.7992	38.0031	84.2389	82.2616
33.051	63.525	137.685	75.750	393	24.9653	54.1102	29.7698	62.9685	138.3491	112.0314
40.717	40.140	206.370	104.790	250	10.0350	51.5925	26.1975	73.0035	189.9416	138.2289
48.35	33.065	74.290	58.830	600	19.8390	44.5740	35.2980	92.8425	234.5156	173.5269
59.033	37.970	168.985	86.155	477.5	18.1307	80.6903	41.1390	110.9731	315.2059	214.6659
64.016	44.185	160.690	104.460	250	11.0463	40.1725	26.1150	122.0194	355.3784	240.7809
70.849	37.140	81.995	36.320	451	16.7501	36.9797	16.3803	138.7695	392.3582	257.1612
79.999	42.065	184.095	82.880	308	12.9560	56.7013	25.5270	151.7256	449.0594	282.6883
87.982	7.345	123.065	39.335	282.5	2.0750	34.7659	11.1121	153.8005	483.8253	293.8004
97.132	6.340	50.945	15.045	440	2.7896	22.4158	6.6198	156.5901	506.2411	300.4202

Tabla 26. Concentración, cantidad excretada y cantidad acumulada excretada de metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH), determinadas en el voluntario 2.

En la Gráfica 9 se muestran los resultados de las cantidades acumuladas del metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH) hasta las 97 horas para el voluntario 2.

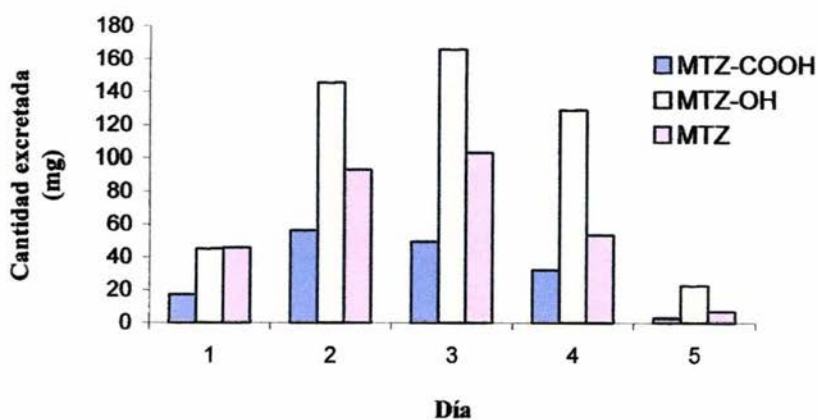


Gráfica 9. Cantidad excretada acumulada del metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH), metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH) y metronidazol (MTZ) en función del tiempo, en el voluntario 2.

Resultados

El perfil de la cantidad acumulada excretada de MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ, para el individuo 2, alcanza el estado estacionario. Gráfica 9.

En la Gráfica 10, voluntario 2 se muestra la cantidad que excretó de MTZ y la que metabolizó en MTZ-COOH y MTZ-OH en los 5 días de muestreo.



Gráfica 10. Voluntario 2, cantidad excretada de los tres compuestos: MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ, por día.

Resultados

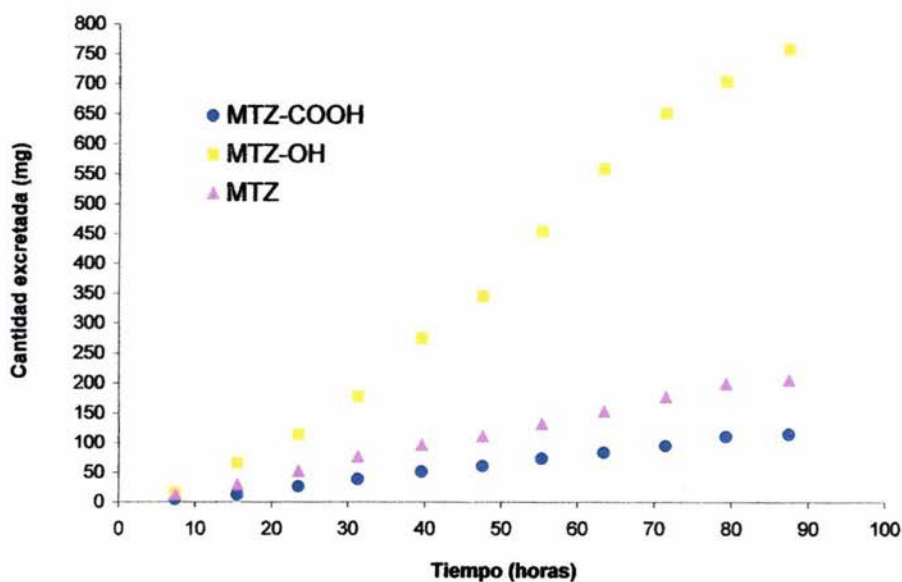
En la tabla 27 se muestran los resultados de la excreción del metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH) en el voluntario 3, durante el tiempo de muestreo

Tiempo de muestreo (horas)	Concentración MTZ-COOH (µg/mL)	Concentración MTZ-OH (µg/mL)	Concentración MTZ (µg/mL)	Volumen de orina (mL)	Cantidad excretada MTZ-COOH (mg)	Cantidad excretada MTZ-OH (mg)	Cantidad excretada MTZ (mg)	Cantidad acumulada excretada MTZ-COOH (mg)	Cantidad acumulada excretada MTZ-OH (mg)	Cantidad acumulada excretada MTZ (mg)
7.29	10.605	38.360	30.230	410	4.3481	15.7276	12.3943	4.3481	15.7276	12.3943
15.46	17.970	118.930	39.990	420	7.5474	49.9506	16.7958	11.8955	65.6782	29.1901
23.46	25.690	90.080	42.635	535	13.7442	48.1928	22.8097	25.6396	113.8710	51.9998
31.23	25.265	129.290	48.315	495	12.5062	63.9986	23.9159	38.1458	177.8696	75.9158
39.53	31.440	239.765	49.320	400	12.5760	95.9060	19.7280	50.7218	273.7756	95.6438
47.53	34.675	265.190	56.135	267.5	9.2756	70.9383	15.0161	59.9973	344.7139	110.6599
55.26	34.870	307.110	59.515	355	12.3789	109.0241	21.1278	72.3762	453.7379	131.7877
63.38	26.400	259.825	52.250	400	10.5600	103.9300	20.9000	82.9362	557.6679	152.6877
71.38	16.510	133.205	34.650	692.5	11.4332	92.2445	23.9951	94.3694	649.9124	176.6828
79.21	27.205	90.190	37.265	587.5	15.9829	52.9866	21.8932	110.3523	702.8990	198.5760
87.44	6.270	80.680	9.705	675	4.2323	54.4590	6.5509	114.5846	757.3580	205.1269

Tabla 27. Concentración, cantidad excretada y cantidad acumulada excretada de metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH), determinadas en el voluntario 3.

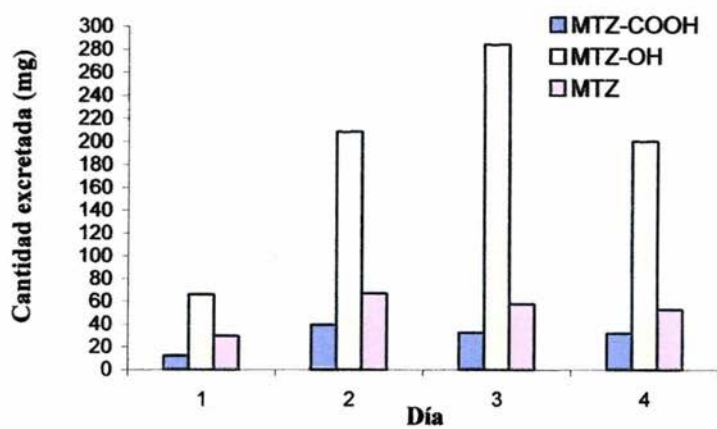
En la tabla 27 se muestra que el MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ aun no se han excretado en su totalidad a las 87.44 horas.

En la Gráfica 11 se muestran los resultados de las cantidades acumuladas del metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH) hasta las 87.4 horas para el voluntario 3.



Gráfica 11. Cantidad excretada acumulada de metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH), de metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH) y de metronidazol (MTZ) en función al tiempo, en el voluntario 3.

En la Gráfica 12 se muestra la cantidad que metabolizó el voluntario 3 y la cantidad de fármaco inalterado.



Gráfica 12 Compuesto MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ excretados en cada día de muestreo por el voluntario 3.

Resultados

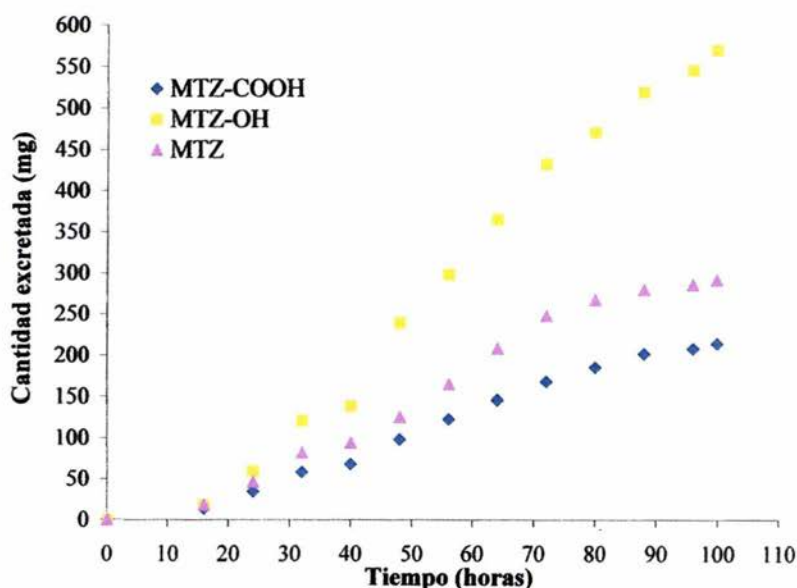
En la tabla 28 se muestran los resultados de la excreción de metronidazol y sus dos metabolitos principales en el voluntario 4, durante el tiempo de muestreo.

Tiempo de muestreo (horas)	Concentración MTZ-COOH (µg/mL)	Concentración MTZ-OH (µg/mL)	Concentración MTZ (µg/mL)	Volumen de orina (mL)	Cantidad excretada MTZ-COOH (mg)	Cantidad excretada MTZ-OH (mg)	Cantidad excretada MTZ (mg)	Cantidad acumulada excretada MTZ-COOH (mg)	Cantidad acumulada excretada MTZ-OH (mg)	Cantidad acumulada excretada MTZ (mg)
15.92	12.540	17.030	16.740	1040.000	13.0416	17.7112	17.4096	13.0416	17.7112	17.4096
23.97	24.710	49.300	33.835	840.000	20.7564	41.4120	28.4214	33.7980	59.1232	45.8310
31.953	30.880	77.275	45.685	785.000	24.2408	60.6609	35.8627	58.0388	119.7841	81.6937
39.936	11.645	21.805	14.030	827.500	9.6362	18.0436	11.6098	67.6750	137.8277	93.3036
47.919	46.465	158.300	49.135	635.000	29.5053	100.5205	31.2007	97.1803	238.3482	124.5043
55.902	40.045	95.285	63.720	615.000	24.6277	58.6003	39.1878	121.8080	296.9485	163.6921
63.885	47.345	137.015	88.450	490.000	23.1991	67.1374	43.3405	145.0070	364.0858	207.0326
71.868	53.945	165.030	97.435	407.500	21.9826	67.2497	39.7048	166.9896	431.3356	246.7373
79.851	24.680	55.380	28.180	690.000	17.0292	38.2122	19.4442	184.0188	469.5478	266.1815
87.834	29.285	85.740	21.985	566.500	16.5900	48.5717	12.4545	200.6088	518.1195	278.6360
95.817	16.585	73.335	16.190	362.500	6.0121	26.5839	5.8689	206.6208	544.7034	284.5049
99.734	12.955	49.735	12.380	485.000	6.2832	24.1215	6.0043	212.9040	568.8249	290.5092

Tabla 28. Concentración, cantidad excretada y cantidad acumulada excretada de MTZ , MTZ-COOH y MTZ-OH, determinadas en el voluntario 4.

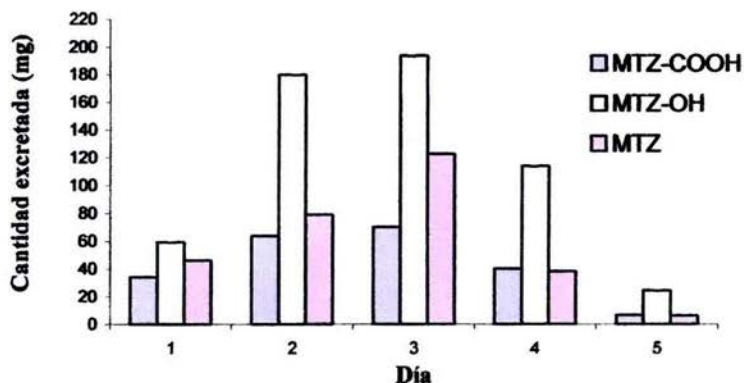
En la tabla 28 se muestra que a las 99.734 horas aun hay presencia de MTZ-COOH (6.2832mg), MTZ-OH (24.1215 mg) y MTZ (6.0043 mg) en el individuo 4.

En la Gráfica 13 se muestran los resultados de las cantidades acumuladas del metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH) hasta las 99.7 horas para el voluntario 4.



Gráfica 13. Cantidad excretada acumulada del metabolito ácido acético del metronidazol (MTZ-COOH), metabolito hidroxilado del metronidazol (MTZ-OH) y metronidazol (MTZ) en función al tiempo, en el voluntario 4.

En la Gráfica 14 se muestra la cantidad que metabolizó el voluntario 4 en MTZ-COOH, MTZ-OH y fármaco inalterado (MTZ) en los 5 días de muestreo.



Gráfica 14. Voluntario 4, cantidad excretada de MTZ, MTZ-COOH y MTZ-OH en cada día de muestreo.

El porcentaje de la cantidad excretada de cada compuesto se obtuvo tomando en cuenta la dosis total suministrada y la cantidad excretada de cada compuesto (considerando el porcentaje de recuperación del método para cada compuesto).

El primer voluntario excretó por vial renal el 11.6 % de la dosis administrada como fármaco inalterado (MTZ) y metabolizó el 59.2 % en MTZ-COOH y MTZ-OH; de MTZ-OH excretó el 38.6% y de MTZ-COOH el 20.6 %. de la dosis hasta las 125 h. de muestreo. El segundo voluntario metabolizó el 40.1 % de la dosis administrada en MTZ-COOH y MTZ-OH en 97.132 h.: el 10.1 % en MTZ-COOH y el 30 %. en MTZ-OH. De fármaco inalterado excreto el 13.5 %.

El tercer voluntario hasta las 87.44 h. excretó el 9.2 % de la dosis administrada como MTZ y hasta ese tiempo metabolizó el 52.3 % de la dosis en MTZ-COOH (el 7.4%) y en MTZ-OH (el 44.9%).

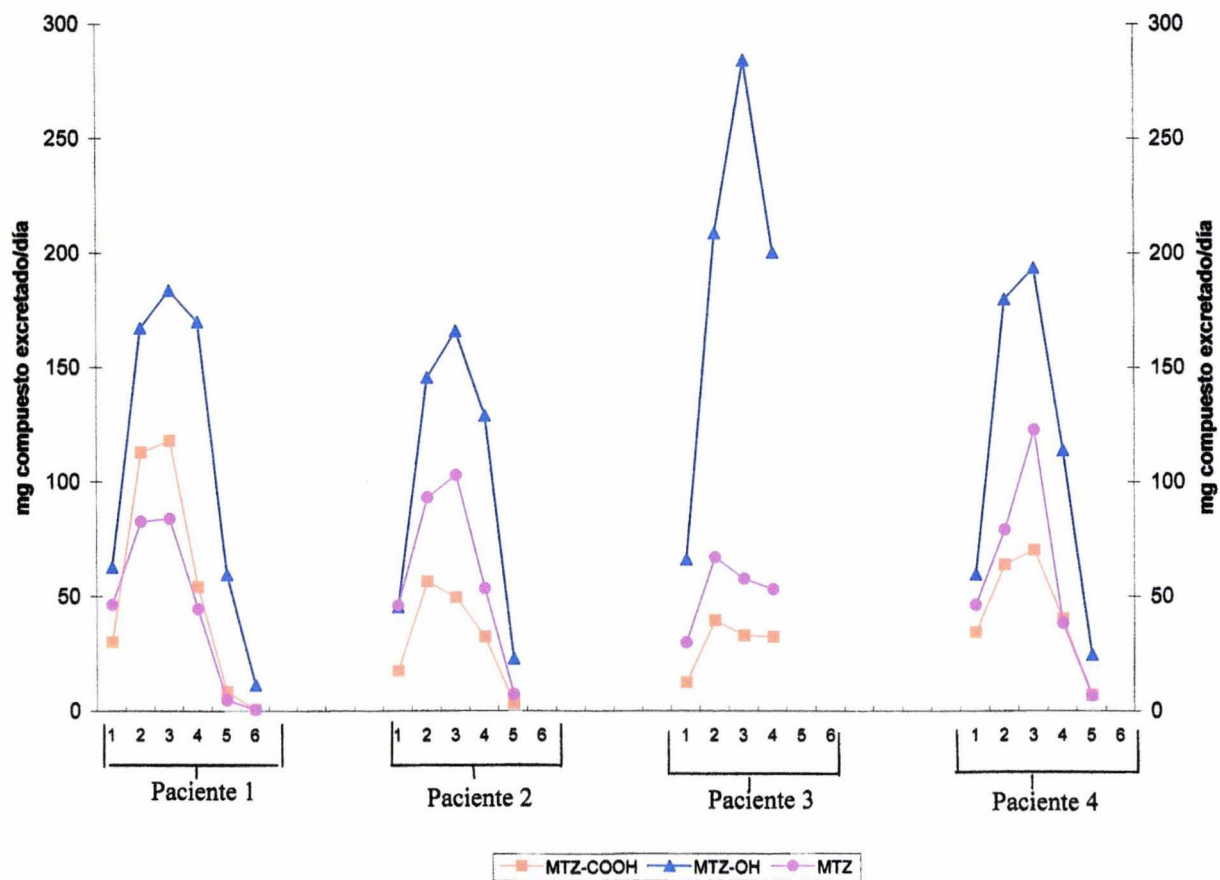
El cuarto voluntario metabolizó a las 99.73 horas el 47.4% de la dosis administrada: MTZ-COOH el 13.7% y el 33.7% en MTZ-OH y excretó como fármaco inalterado el 13% de la dosis administrada.

En la Gráfica 23 se muestra de forma global el comportamiento que se obtuvo en la excreción del metronidazol y sus dos metabolitos en cada día del estudio para los cuatro voluntarios.

En la Tabla 29 se encuentran los parámetros farmacocinéticos obtenidos de cada compuesto en los cuatro voluntarios.

Voluntario	MTZ-COOH			MTZ-OH			MTZ		
	ABC	t _{1/2} (horas)	Ke (1/h)	ABC	t _{1/2} (horas)	Ke (1/h)	ABC	t _{1/2} (horas)	Ke (1/h)
1	56939.5	5.38	0.1288	235961.7	11.72	0.0592	43323.6	4.55	0.1523
2	15099.0	7.73	0.0896	134429.7	12.80	0.0542	42014.4	8.80	0.0788
3	54850.1	8.31	0.0834	323685.3	19.95	0.0348	54865.1	8.31	0.0834
4	98736.9	23.74	0.0292	496818.0	49.09	0.0141	90265.6	14.26	0.0486

Tabla 29. Parámetros farmacocinéticos de metronidazol (MTZ) y sus dos metabolitos (MTZ-COOH y MTZ) en los cuatro voluntarios.



Gráfica 15. Cantidad excretada de metronidazol (MTZ) y sus dos principales metabolitos (MTZ-COOH y MTZ-OH) por los cuatro voluntarios del estudio en el tiempo de muestreo que siguió cada uno.

6. DISCUSIÓN

El objetivo planteado para el presente trabajo; el cual fue, por una parte el desarrollo de una técnica para cuantificar metronidazol y sus dos principales metabolitos en una forma precisa, reproducible y exacta, sustentada en criterios de validez y confiabilidad marcados por la NORMA OFICIAL MEXICANA; y por otra parte la aplicación de éste método en sujetos que recibieron un tratamiento de metronidazol a fin de analizar las posibles diferencias en el metabolismo de este fármaco.

6.1 Diseño de una nueva micro técnica para la cuantificación en orina de metronidazol y sus dos principales metabolitos.

Este diseño comprende dos innovaciones: a) las condiciones cromatograficas y b) el método de extracción.

a) Las condiciones cromatográficas. En la elección de la fase móvil y pH del amortiguador empleado para la separación del MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ; se tomaron en cuenta dos parámetros de retención: selectividad, α , ($\alpha > 1.2$) y factor de capacidad, k' , ($2 \leq k' \leq 10$). En el caso de la fase móvil: no se obtuvo un valor de k' esperado: los compuestos MTZ-COOH y MTZ-OH no se separaron. Con $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 0.01M, pH = 4 / CH_3CN (90:10, v/v) sí se obtuvo una separación entre estos compuestos; por ello para tener un mejor amortiguamiento en la unidad de pH deseada se empleo la fase móvil de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0.01M a diferentes pH = 3.3, 3.6, 4, 4.4, 4.6 y CH_3CN a diferentes proporciones (ver tabla 2); de los cuales el que resultó con valores de α y k' más cercanos a los esperados fue la fase móvil de pH = 4 empleando la condición 4 de la tabla 2 correspondiente a un sistema isocrático; sin embargo el tiempo de retención del E.I. bajo estas condiciones era muy grande, MTZ-COOH y MTZ-OH no se separaban por completo; por ello con objeto de mejorar la resolución de los compuestos en el cromatograma y acortar el tiempo de corrida se estudiaron diferentes sistemas de gradiente (Apéndice 1: Tabla 1a, 2a, 3a, 4a, 5a y 6a) en la tabla 5 capítulo 5 se muestra el gradiente al que se llegó para separar los compuestos con $\alpha > 1.2$ y $2 \leq k' \leq 10$, en este sistema el tiempo de

retención para MTZ-COOH fue de 3 min., para MTZ-OH de 4 min., para MTZ de 6.9 min. y para E.I. (tinidazol: TZN) 13.8 min.; el tiempo de corrida fue de 16.4 min. (Figura 2). De esta manera, después de analizar y aplicar diferentes sistemas se desarrolló uno totalmente nuevo.

b) El método de extracción. La detección se llevó a cabo en orina, ya que en este fluido biológico es posible detectar y cuantificar cantidades del metabolito ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol sin importar la administración a dosis bajas de éste fármaco; además que se trata de un método de muestreo no invasivo.

El empleo de los solventes: éter, diclorometano, acetato de etilo, cloruro de metileno, metanol, etanol e isopropanol a diferentes proporciones. no resultaron ser útiles para obtener una extracción selectiva; por lo que se decidió elegir como solvente de extracción acetonitrilo. Este método fue desarrollado al considerar lo reportado por J. Jensen y Gugler en 1983; quienes emplean metanol para la extracción sin ser ésta propiamente una extracción; ya que nunca separan la fase orgánica de la acuosa. En el método creado en la presente investigación si se logró esta separación aún cuando el solvente empleado (acetonitrilo) es miscible en agua al igual que el metanol. En este nuevo método además se utilizó ácido acético para protonar la especie ácida. El método con una extracción cuantitativa de los cuatro compuestos se muestra en el Esquema 1 (pag. 33).

6.2 Validación del método analítico en orina para la cuantificación de metronidazol y sus dos metabolitos principales.

La selectividad del método de extracción en orina para el ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol (MTZ-COOH), 1-(2-hidroxietyl)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol (MTZ-OH) y 1-(2-hidroxietyl)-2-metil-5-nitroimidazol (MTZ), se evaluó con la extracción de orina blanco (Figura 3), en donde se observa que no se extrae ningún compuesto del fluido

biológico que tenga tiempos de retención igual al de los compuestos: MTZ-COOH, MTZ-OH, MTZ y E.I. (Figura 4).

Para determinar la linealidad del método que describe la relación matemática entre concentración y respuesta, en apego a la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, se construyeron en dos días las seis curvas para cada compuesto: MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ (tabla 6, 7 y 8). Los valores de las respuestas que se obtuvieron para cada concentración fueron similares en todas las curvas; por lo que la variación entre ellas resulta estar dentro del rango establecido por la NORMA ($C.V. \leq 15\%$). En el compuesto MTZ-COOH el coeficiente de variación estuvo dado entre 4.9% y 11.9 % (Tabla 6); para el MTZ-OH entre 2.1% y 13.8% (Tabla 7), y en el compuesto de MTZ entre 2.9% y 13.8% (Tabla 8); en todos los casos el coeficiente de variación porcentual mayor correspondió a la concentración más pequeña de la curva.

El método de extracción en orina para el metronidazol y sus dos principales metabolitos fue lineal en el intervalo de concentraciones de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ – 75 $\mu\text{g/mL}$. Para el compuesto MTZ-COOH el coeficiente de determinación (r^2) fue de 0.9979 y la pendiente de la recta de 0.1237 (Gráfica 1); en el compuesto MTZ-OH r^2 fue de 0.9997 y la pendiente de 0.1456 (Gráfica 2) y para el compuesto MTZ r^2 fue de 0.9998 y la pendiente de 0.2307 (Gráfica 3); por lo que el intervalo de trabajo establecido es reproducible y continuo a lo largo de todo éste.

El método para la cuantificación de MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ no presentó variabilidad *intra* día; fue repetible a lo largo del rango establecido, cumpliendo con los parámetros señalados por la NORMA para repetibilidad, que es evaluada como precisión y exactitud, con quintuplicados de los tres controles (alto: 35 $\mu\text{g/mL}$, medio: 15 $\mu\text{g/mL}$, y bajo: 1 $\mu\text{g/mL}$) realizados en un mismo día. En lo referente a la precisión, el coeficiente de variación resultó de 5.7% para el MTZ-COOH (Tabla 9), de 4.5% para MTZ-OH

(Tabla 10) y de 3.7% para MTZ (Tabla 11). Siendo estos valores inferiores al 15% señalado como máximo permitido por la NORMA. En el caso de la exactitud, se obtuvieron los siguientes

intervalos: para MTZ-COOH de 94.0% a 98.2%, para MTZ-OH de 92.6% a 98.3% y para MTZ de 96.2% a 102.7% (Tablas 9, 10 y 11). Estas cifras de exactitud se determinaron con base en el porcentaje de error relativo obtenido para cada concentración, el cual en ningún caso resultó superior al $\pm 7\%$. El máximo valor permitido por la NORMA para definir la exactitud es del $\pm 15\%$.

La reproducibilidad del método en orina se evaluó en tres días diferentes, con triplicados de los controles (alto, medio y bajo), para los dos primeros días y cuadruplicados para el tercer día. Ningún control de MTZ-COOH presentó un coeficiente de variación mayor al 7.9% y el rango de exactitud estuvo dado entre 97.5% y 100.9%; para MTZ-OH el coeficiente de variación en los tres controles fue menor a 8.3%, el rango de exactitud fue de 101.1% a 102.3%; en el caso del MTZ el coeficiente de variación no rebasó el 10% y la exactitud estuvo entre 98.9% y 101.5% (ver Tablas 12, 13 y 14); con estos resultados se observa que no hay variabilidad *interdía*, *intradía* y que el método es lineal a lo largo del rango establecido. Lo cual demuestra la validez y confiabilidad del método en el estudio realizado.

El porcentaje de recobro se analizó tomando en cuenta las pendientes promedio de las rectas hechas en solución y en orina. La recuperación no es del 100% para los compuestos estudiados; pero ésta es reproducible a lo largo de todo el rango. En este trabajo si se llevó a cabo propiamente una extracción de los cuatro compuestos por ello no se alcanzan porcentajes de recuperación tan altos como los reportados en otros métodos (Thomsen y col. 1995^[37], Jensen y Gugler 1983^[38] Nilsson – Ehle y col. 1981^[40] y Loft y col. 1986^[41]) para cuantificar metronidazol y sus metabolitos; ya que en estos solo hacen mezcla de solventes miscibles y toman ésta e inyectan o bien la evaporan, resuspenden e inyectan; lo

que indica que no pueden tener pérdidas de los compuestos y que además no es un método muy selectivo pues su inyección tiene todos los compuestos que se han excretado en la orina. En el caso de Nilsson – Ehle *et al.* 1981^[40] si hacen una extracción propiamente, pero al recuperar la fase acuosa tienen el riesgo de tener también otros compuestos muy polares en su fase y puede llegar a ser poco selectivo su método.

El límite de cuantificación se analizó con quintuplicados de la concentración más baja de la curva (0.5µg /mL), para cada compuesto. En todos los casos el coeficiente de variación fue menor al 10.5% y el error en la concentración determinada para los tres compuestos fue menor a $\pm 5.7\%$ (ver Tabla: 16).

El límite de detección fue 0.05 µg/mL para los 3 compuestos; diez veces menor a la concentración establecida como límite de cuantificación, lo que permite observar concentraciones muy pequeñas de los tres compuestos cuando se estén eliminando casi por completo.

Para la evaluación de la estabilidad en orina de metronidazol y sus dos principales metabolitos a 48 horas a temperatura ambiente se realizaron dos curvas, ambas cumplían con el C.V. (%) establecido en el método. La estabilidad en congelación se midió construyendo tres curvas en un mismo día y a parte se dejó muestra en congelación (-10°C) durante un periodo de 23 días (Tablas: 20, 21 y 22). Las muestras en congelación se compararon con las muestras realizadas ese mismo día (Gráficas: 4, 5 y 6). La recta (promedio de las tres curvas) tanto congelada como sin congelar tuvieron pendientes similares, en el compuesto MTZ-COOH sin congelar fue de 0.1543 y congelada 0.1568, para MTZ-OH sin congelar 0.2496 y congelado 0.2514, por último en MTZ sin congelar 0.2496 y congelado 0.2514. Lo que indica que el metronidazol y sus dos principales metabolitos en orina se pueden almacenar bajo estas condiciones hasta su análisis teniendo la certeza de que los resultados serán confiables.

6.3 Estudio del metabolismo del metronidazol en cuatro pacientes, mediante el método analítico establecido.

La aplicación de la nueva técnica para observar y analizar las diferencias en el metabolismo del metronidazol en diferentes sujetos comprendió un muestreo de 125 horas en el primer individuo, en el segundo de 97.132 horas, en el tercero de 87.44 horas y en el cuarto de 99.734 horas, ver Tablas: 23, 25, 26 y 27.

En el primer voluntario al tiempo de muestreo de 122 horas ya no se observa metronidazol ni metabolito ácido acético del metronidazol en orina; sin embargo la excreción del metabolito hidroxilado del metronidazol aun continuó a las 125 horas en cantidades de 2.029 mg, ver Tabla 25. En el caso del segundo individuo al cabo de 97.13 horas aún presentó en orina MTZ-COOH (2.7896 mg), de MTZ-OH (22.4158 mg) y de MTZ (6.6198 mg), Tabla 26. En el tercer voluntario a las 87.44 horas se cuantificó MTZ-COOH (4.2323 mg), MTZ-OH (54.459 mg) y MTZ (6.5509 mg), Tabla 27. En el cuarto sujeto a las 99.734 horas existía aun en orina MTZ-COOH (6.2832mg), MTZ-OH (24.1215 mg) y MTZ (6.0043 mg), Tabla 28. Se puede observar que el tercer voluntario todavía excretaba cantidades elevadas de MTZ-OH en la última recolección de orina (87.44 h).

El perfil de la cantidad acumulada excretada en el fluido urinario, en el primer individuo (Gráfica 7) y en el segundo (Gráfica 9), alcanzan el estado estacionario tanto para el metronidazol como para sus dos metabolitos principales. Pero se observa que se debió muestrear más tiempo al tercero (Gráfica 11) y al cuarto (Gráfica 13) para que se notara claramente el estado estacionario del MTZ-OH.

En todos los individuos se observa que la mayor cantidad excretada de los tres compuestos (MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ) se da en el segundo y tercer día de muestreo; en el caso del MTZ-COOH se observa que el primer individuo, en el segundo día de muestreo, excreta el doble de la cantidad de MTZ-COOH comparado con el segundo voluntario y casi el triple comparado con el tercero (gráficas: 8, 10 y 12). En la excreción del compuesto MTZ-OH se observan diferencias mayores en el tercer día entre el individuo 2 y 3 (excretando 118.5 mg más el tercer individuo) (Gráficas: 10 y 12); en el quinto día de muestreo el

voluntario 1 excretó más del doble de la cantidad de MTZ-OH que lo excretado tanto por el individuo 2 y 4 (gráficas: 8, 10 y 14). Así mismo en la excreción de MTZ se observan mayores diferencias entre el sujeto 3 y 4 en el tercer día de muestreo; excretando este último más del doble de la cantidad (122.23 mg) de MTZ que lo que excretó (57.04 mg) el tercer individuo el mismo día, ver Gráficas: 12, y 14. Con estos resultados se observa claramente que hay diferencias entre individuos en las cantidades excretadas por día de cada compuesto.

Los parámetros farmacocinéticos que se obtuvieron para cada voluntario fueron: área bajo la curva (ABC), constante de eliminación del compuesto (K_e) y tiempo de vida media. ($t_{1/2}$) Tabla 29. Se observa que hay una variabilidad entre individuos muy grande. En el caso del voluntario 4 se observa que los valores de $t_{1/2}$ y K_e para los tres compuestos están alejados de los estimados para los demás voluntarios; esto es debido a que el tiempo de muestreo de este individuo debió haber sido mayor para alcanzar con más puntos el estado estacionario y así obtener un mejor calculo en los parámetros.

Los datos obtenidos muestran que si bien no existen diferencias estadísticamente significativas en las cantidades excretadas entre los individuos, si se observa gráficamente diferencias entre días y en la cantidad excretada de cada metabolito entre los voluntarios (ver Gráfica 15). De esta manera se muestra que pueden existir diferencias en el metabolismo del metronidazol a nivel individual y por ende el posible daño genotóxico para cada persona puede ser variable como puede observarse en los datos reportados por Elizondo, Gonsebatt, y *col.*^[33] donde se observan diferencias individuales, tanto en la inducción de aberraciones cromosómicas como en la concentración de MTZ en plasma y además el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas no correlaciona con las concentraciones de MTZ en plasma encontradas en los individuos; lo que sugiere que el metabolismo del metronidazol juega un papel importante en la genotoxicidad de este medicamento.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

7. CONCLUSIONES

Con base en el planteamiento establecido y considerando los resultados obtenidos en la investigación se puede concluir lo siguiente:

1. Se creó una **nueva micro-técnica**, empleando la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para el análisis en orina de metronidazol y simultáneamente sus dos principales metabolitos, empleando tinidazol como estándar interno. Este método cumple ampliamente con los parámetros señalados por la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 para la validación de métodos analíticos.
2. El diseño del nuevo método comprende dos innovaciones que se refieren a: a) condiciones cromatográficas: fase móvil $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0.01M / CH_3CN pH = 4 con un sistema de gradiente y el empleo de una columna Symmetry® C18 como fase estacionaria y b) método de extracción utilizando CH_3CN y ácido acético.
3. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas en las cantidades excretadas de MTZ y sus dos principales metabolitos entre individuos, sin embargo sí se observan diferencias entre los individuos al analizar las concentraciones de metronidazol y sus dos principales metabolitos en orina. Por lo que se puede inferir que al existir diferencias en el metabolismo del metronidazol a nivel individual el posible daño genotóxico para cada persona podría ser variable. Es importante el desarrollo de futuras investigaciones para determinar la posible correlación entre estos factores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Samuelson J. *Why metronidazole is active against both bacteria and parasites* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43 (7): 1533-1541.
2. Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. *Metronidazole. A therapeutic review and update.* Drugs. 1997, 54 (5):679-708.
3. OMS. Medicamentos Esenciales 13.^a edición. Lista Modelo de la OMS (revisada en abril de 2003).
http://www.who.int/medicines/organization/par/edl/expcom13/eml13_sp.pdf
4. Drug Information for the Health Care Professional. USP DI, Vol. I, 20 edición; Micromedex, 2000.
5. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/news/fullstory_20166.html
6. Goodman & Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la terapéutica.* 9^o Edición Vol. II McGraw-Hill Interamericana 1996, pp.1058-1059.
7. IARC. International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity.* Lyon, France: IARC, 1987, Supplement 7. p. 440.
8. The Merck Index 8^o edición 1968.
9. Dobiáš L., Černá M., Rössner P., Šrám R., *Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole* Mutation Research, 1994, 317:177-194.
10. Vidakovic M., Crossnoe C. R., Neidre C., Kim K., Krause K. L., Germanas J. P. *Reactivity of Reduced [2Fe-2S] Ferredoxins Parallels Host Susceptibility to Nitroimidazoles.* Antimicrob. Agents chemother. 2003, 47 (1): 302–308.
11. Casarett and Doull's. *The basic science of poisons.* Toxicology 6^o edición, Mc. Graw Hill 2001.
12. Loft S, *Metronidazole and antipyrine as probes for the study of foreign compound metabolism.* Pharmacol Toxicol, Review, 1990, 66 (6): 1-31.
13. Meckee T., Mckee J. R., *Biochemistry* Wm. C. Brown Publishers, 1996.

14. Loft S., Otton S.V., Lennard M.S., Tucker G.T., y Poulsen H.E. *Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes*. *Biochemical Pharmacology*. 1991, 41 (8): 1127-1134.
15. Ronald L. Koch, Bernard B. Beaulieu Jr., Ewan J. T. Chrystal and Peter Goldman. *A metronidazole metabolite in human urine and its risk*. *Science*, 1981, 211 (23): 398-400.
16. Lewis D.F.V., y Sheridan G. *Cytochromes P450, oxygen and evolution*. *The Scientific World. Review*, 2001, (1) 151-167.
17. Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nitroimidazole antimicrobials* *Clin Pharmacokinet*, 1999, 36 (5): 353-73.
18. Lau A.H., Lam N.P., Piscitelli S.C., Wilkes L., Danziger L.H. *Clinical pharmacokinetics of metronidazole an other nitroimidazoles anti-infectives*. *Clin. Pharmacokin*, 1992, 23 (5): 328-364.
19. Lares-Asseff I., Cravioto J., Santiago P. y Perez-Ortiz B. *A new dosing Regimen for metronidazole in malnourished children*. *Scand J. Infect. Dis*. 1993, 25: 115- 121.
20. Passmore CM, McElnay JC, Rainey EA, D'Arcy PF. *Metronidazole excretion in human milk and its effect on the suckling neonate*, 1988, 26 (1): 45-51.
21. David FL, Da Silva CM, Mendes FD, Feraz JG, Muscara MN, Moreno H, De Nucci G y Pedrazzoli J. *Acid supresión by omeprazole does not affect orally administered metronidazole bioavailability and metabolism in healthy male volunteers*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 1998, 12 (4): 349-54.
22. Jessa MJ, Goddard AF, Barrett DA, Shaw PN, Spiller RC. *The effect of omeprazole on the pharmacokinetics of metronidazole and hydroxymetronidazole in human plasma, saliva and gastric juice*. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1997, 44 (3): 245-53.

23. Moraes ME, Pierossi MD, Moraes MO, Bezerra FF, Da Silva CM, Dias HB, Muscara MN, De Nucci G, Pedrazzoli Junior J. *Short-term sucralfate administratioln does not alter the absorption of metronidazole in healthy male volunteers*. International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics, 1996, 34 (10): 433-7.
24. Haas C.E., Kaufman D.C., DiCenzo R.C. *Effects of metronidazole on hepatic CYP 3A4 activity*. Pharmacotherapy 2001, 21 (10): 1192-1195.
25. Williams CS, Woodcock KR. *Do ethanol and metronidazole interact to produce a disulfiram-like reaction?* Ann Pharmacother. 2000; 34 (2): 255-7.
26. Gonzalez Saldaña N., Saltigeraa Sinendal P. Guía de Antimicrobianos, Antivirales, Antiparasitarios y Antimicóticos. 3º edición, 1990, p.p. 122-125.
27. Voogd C.E, Van der Stel .J.J, y Jacobs J.J.J.A.A. *The mutagenic action of nitroimidazole, dimetridazole and ronidazole*. Mutation Res. 1974, 26: 483-490.
28. Rustia M., y Shubik P. *Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole*. J. Natl. Cancer Inst. 1972, 48: 721-729.
29. La Russo N.F, Tomasz M., Muller y Lipman R. *In vitro interaction of metronidazole with nucleic acids*. Mol. Pharmacol. 1977, 13: 872.
30. Connor T.H.; Stoeckel M; Evrard J; Legator M.S. *The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice*. Cancer Res. 1977, 37 (2): 629-633.
31. Ralph ED, Amatnieks YE. *Relative susceptibilities of Gardnerella vaginalis (Haemophilus vaginalis), Neisseria gonorrhoeae and Bacteroides fragilis to metronidazole and its two major metabolites*. Sex Transm. Dis. 1980, 7 (4): 157-160.
32. <http://www.fda.gov/medwath/safety/1997/may97.htm#quick>
33. Lambert B., Lindblad A. y Ringborg U. *Absence of genotoxic effects of metronidazole and two of its urinary metabolites on human lymphocytes in vitro*. Mutation Research 1979, 67: 281-287.

34. Ré J.L., De Méo M.P., Laget M., Guiraud H., Castegnaró M., Vanelle P., Duménil G. *Evaluation of the genotoxic activity of metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay*. *Mutat. Res.* 1997, 375: 147-155.
35. Ostrosky-Wegman P., Asseff I.L., Santiago P., Elizondo G., Montero R.. *Metronidazole hprt mutation induction in sheep and the relationship with its elimination rate*. *Mutat. Res.* 1994, 307: 253-259.
36. Elizondo G., Gonsebatt M. E., Salazar A. M., Lares I., Santiago P., Herrera J., Hong E., Ostrosky-Wegman P. *Genotoxic effects of metronidazole*. *Mutat. Res.* 1996, 370: 75-80.
37. Giknis ML, Damjanov I. *The transplacental effects of ethanol and metronidazole in Swiss Webster mice*. *Toxicol Lett.* 1983, 19 (1-2): 37-42.
38. Roe, F.J.C. *Safety of nitroimidazoles*. *Scand. J. Infect. Dis.* 1985, 46: 72-81.
39. Moskovitz DN, Bodian C, Chapman ML, Marion JF, Rubin PH, Scherl E, Present DH. *The effect on the fetus of medications used to treat pregnant inflammatory bowel-disease patients*. *Am J Gastroenterol.* 2004, 99(4): 656-61.
40. Thomsen U.G, Cornett C., Tjornelund J., Hansen S.H. *Separation of metronidazole, its major metabolites and their conjugates using dynamically modified silic.* *J. Chromatogr. A.* 1995, 697:175-184.
41. Jensen J. C. y Gugler R. *Sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of metronidazole and metabolites*. *J. Chromatogr.* 1983, 277: 381-384.
42. Nilsson – Ehle I, Ursing B. y Nilsson – Ehle P. *Liquid chromatographic assay for metronidazole and tinidazole. Pharmacokinetic and metabolic studies in human subjects*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 1981, 19 (5): 754-760.
43. Jessa M.J., Barrett D.A., Shaw P.N. y Spiller R.C. *Rapid and selective high performance liquid chromatographic method for the determination of metronidazole and its active metabolite in human plasma, saliva and gastric juice*. *J. Chromatogr. B.* 1996, 677: 374-379.

Bibliografía

44. Loft S., Sossing S., Poulsen H.E., Sonne J., Olesen K. L., Simonsen K. y Andreasen P.B. *Influence of dose and route of administration on disposition of metronidazole and its major metabolites*. European Journal of Clinical Pharmacology 1986, 30: 467-473.
45. Douglas A. Skoog y James J. Leary. *Análisis Instrumental*. 4ª edición. Mc. Graw Hill 1996, pp 674-684 y 695-699.
46. NORMA Oficial NOM-177-SSA1-1998. Diario Oficial de la Federación, Tomo DXLVIII No. 4, 1º sección México, D.F. viernes 7 de mayo de 1990.

APÉNDICE

CI. FORMA DE CONSENTIMIENTO

México D.F. a ____ de _____ del 2004.

_____ ^{Nombre completo} estoy de acuerdo en participar de manera voluntaria en el estudio: "Respuestas individuales en el metabolismo del metronidazol" que se llevará a cabo con el fin de estudiar la concentración del metronidazol y sus dos principales metabolitos. Autorizo para que se me realicen las pruebas necesarias de parasitología (tres copros consecutivos), así como una toma de sangre previa al estudio para determinar funcionamiento renal y hepático. Una semana antes y durante el estudio no fumaré ni tomaré bebidas alcoholicas; así mismo a lo largo de éste, cooperaré para la recolecta de orina. Durante el estudio tendré la absoluta libertad de retirarme en cualquier momento, sin sanción o represalia de ningún tipo.

He leído esta forma y todas mis dudas han sido aclaradas satisfactoriamente; estoy de acuerdo en participar en el estudio.

ATENTAMENTE

Nombre

Firma

Testigo 1 (nombre y firma)

Testigo 2 (nombre y firma)

Nombre del Investigador _____

Firma _____

Gradientes estudiados para la separación de MTZ-COOH, MTZ-OH, MTZ y E.I.

Tiempo (min)	Flujo (mL)	% CH ₃ COOH/CH ₃ CO ⁻	%CH ₃ CN
Inicial	1.0	80	20
2	1.0	80	20
6	1.0	60	4
8	1.0	50	50
14	1.0	80	20

Tabla 1a.Gradiente

Tiempo (min)	Flujo (mL)	% CH ₃ COOH/CH ₃ CO ⁻	%CH ₃ CN
Inicial	1.0	95	5
4	1.0	95	5
6	1.0	60	40
13.5	1.0	95	5
14	1.0	95	5

Tabla 2a.Gradiente

Tiempo (min)	Flujo (mL)	% CH ₃ COOH/CH ₃ CO ⁻	%CH ₃ CN
Inicial	0.8	98	2
4	1.0	98	2
6	1.0	90	10
9	1.0	60	40
13.5	1.0	98	2
14	0.8	98	2

Tabla 3a.Gradiente

Tiempo (min)	Flujo (mL)	% CH ₃ COOH/CH ₃ CO ⁻	%CH ₃ CN
Inicial	1.0	98	2
4	1.0	98	2
6	1.0	60	40
13.5	1.0	98	2
14	1.0	98	2

Tabla 4a.Gradiente

Tiempo (min)	Flujo (mL)	% CH ₃ COOH/CH ₃ CO ⁻	%CH ₃ CN
Inicial	1.0	95	5
4	1.0	95	5
7.5	1.0	60	40
13.5	1.0	95	5
14	1.0	95	5

Tabla 5a.Gradiente

Tiempo (min)	Flujo (mL)	% CH ₃ COOH/CH ₃ CO ⁻	%CH ₃ CN
Inicial	1.0	95	5
4	1.0	95	5
9.5	1.0	40	60
13.5	1.0	95	5
14	1.0	95	5

Tabla 6a.Gradiente