

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN
(CLAR) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFALEXINA EN
PLASMA Y SU APLICACIÓN EN UN ESTUDIO DE
FARMACOCINÉTICA**

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTAN

**ROSALES MAÑÓN NELSON
VARGAS DOMÍNGUEZ MAYRA YANET**

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Helgi Helen Jung Cook
Vocal: Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
Secretario: Liz Jannet Medina Reyes
1° Suplente: Lauro Misael del Rivero Ramírez
2° Suplente: Luís Jesús García Aguirre

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL
TEMA:**

Unidad Analítica de Estudios de Bioequivalencia
Facultad de Medicina. Ciudad Universitaria
UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. en F. Liz Jannet Medina Reyes

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. César Arizmendi Montoya

SUSTENTANTES:

Mayra Yanet Vargas Domínguez
Nelson Rosales Mañón

AGRADECIMIENTOS

MAYRA:

Antes que nada y sobre todas las cosas, te debo agradecimiento a Ti que me diste la vida, que aun antes de mi concepción había planes y sueños en Tu corazón para mi, que permitiste el gran milagro de la vida en el vientre de mi madre. Gracias por permitirme la gracia de conocerte. A Ti debo todo, lo que soy, lo que tengo, aun lo que ha de venir lo debo a ti.

Gracias te doy por la bendición de permitirme nacer en mi familia que me enseñó a admirar y amar la vida y todo lo que en ella hay. Por mi papá, que aun sin conocerte le diste la inmensa sabiduría para ser buen esposo y buen padre, por su grande corazón, por permitirme conocer en el una figura de autoridad, solícito en el trabajo, proveedor en cada una de las necesidades que puede haber en una familia (en espíritu, alma y cuerpo), por ese varón que aun hoy en día sigue siendo uno de los hombres que mas admiro, que respeto y que amo. Por mi mamá que ha sido siempre el más grande ejemplo de fortaleza, en donde veo plasmado cada detalle de la mujer virtuosa y de la ayuda idónea, esposa, compañera, madre y sobre todo amiga. Esas dos grandes personas que tengo el privilegio de llamar padres, que cuando en lo mas íntimo de mi corazón ha habido desánimo y que he estado a punto de volver atrás y dejarlo todo, han sido ellos los que me han animado y me han llevado en sus oraciones, y como a las águilas has renovado mis fuerzas, permitiéndome levantar una y otra vez las alas. Gracias

Gracias por permitirme la gran dicha de tener a mi hermano, a quien amo con todo mi corazón, mi amigo, mi compañero, mi cómplice y quien por mucho tiempo fue ejemplo a seguir, por quien me gustaría regresar a ser niños y ser así por siempre. Por que por medio de el me has permitido crecer, y superar muchos obstáculos en mi vida, por que por el he podido conocer un poco de la inmensidad de tu amor para con toda la humanidad. Gracias

Gracias por mi abue Yoya (mi abolita), que ha sido una gran mujer, que ha marcado mi vida simplemente con su vida, con su amor, quien me enseñó la reverencia que se le debe únicamente al Rey de reyes. Por quien he conocido el amor real e incondicional de una madre, porque por medio de ella he podido ver un reflejo de tu amor como padre. Y que espero poder ser una corona digna para su vejez. Gracias.

Gracias por mis tíos; Cabo, Zaca, Saúl y Misa, por que por un tiempo de mi vida ellos suplieron un lugar muy importante en mi corazón, por la nobleza y humildad de sus corazones, a quienes me has permitido conocer y amar. Por mis tías Miriam, Anabel, Noemí y Lupita, por su apoyo y sus oraciones. Por mis primos, mis bebes, a los cuales amo en gran manera, Givi, Magdiel, Arnoldo, Hosama, Jasiel, Eliana, Josué, Isel, Diana y Montse.

Gracias por mi abue Juana, por su vida, porque hiciste de ella una madre para mi padre, aun sin serlo. Porque tengo la gran bendición de pertenecer a esta gran familia, en donde hay un lazo muy fuerte que nos une, y has permitido que crezca cada día mas y mas. Por mis tías Aurora y Gloria, mis tíos Nerio, Joel y Tello, y sus esposas Amparo y Gloria. Por mis primos Nerio, Nena, Pelusa, Pacho, Joelito, Rosi, Caro, Riki y

Gabi. Y mi sobrina Yiara. Por que me has enseñado con ellos a reír, por su alegría y las cosas que me has permitido aprender de cada uno.

Gracias, por todos mis tíos de Medias Aguas, Cheve, Ñeco, Oscar, Gilberto, Sofía, sus esposas y por todos, que si los mencionara no terminaría de enlistarlos.

Una cosa no puedo pasar por alto, pues han sido una parte muy importante en mi vida y de este ciclo que esta cerrándose, aunque en ocasiones no sepa reconocerlos. Te doy muchas gracias porque a lo largo de mi vida nunca me has dejado sola, y cuando me llegue a sentir así, Tu has traído a mi vida a personas de inigualables virtudes, diferentes cada uno de otro, pero cada uno de ellos tan importantes en distintas etapas y no menos especiales de mi vida, que ahora ellos han colaborado a lo que hoy soy. Ellos son mis amigos, o talvez simplemente personas que has puesto ahí en el lugar y el momento adecuados para lograr hacerme la carga ligera, disfrutar y compartir de cosas buenas y aun de las malas y difíciles. Tal vez no debería ni siquiera mencionarlos pues tanto tú como ellos mismos ya saben quienes son. Gente hermosa que han estado en mi vida y algunas que aun me han soportado desde primaria o prepa pero que siguen estando aquí, presentes en mi vida.

Gracias te doy por la vida de Gabi y la de Liz por el amor y apoyo que depositaste en ellas, por que aun a pesar de la distancia y del tiempo siguen estando ahí soportándonos nuestras debilidades y defectos.

Gracias por todos los de la canasta, sin los cuales tal vez hubiese sido la carrera mas difícil: Moni por esa gran comprensión, Rebe por esa paciencia, Cesi y su vitalidad para hacer la cosas, Hugo por su apoyo y amistad y por Ale con quien también pude abrir mi corazón, por sus abrazos y por que la pusiste ahí, talvez en los momentos mas difíciles que he llegado a vivir en esta ciudad. Por todos los de ese primer semestre, Lili, Benji, Jhon-Jhon, Belmar, Yeni, Yanet, Victor, Oscar, Luís, Pash.

También por cada uno de los integrantes de ese grupo que inicio con 5 personas "Aliento a los Huesos" y por Luisito que dejo un grato recuerdo en esos últimos semestres.

Gracias por los maestros Liz y Luís, con quienes me enseñaste que es posible trabajar en un ambiente de camaradería más que de subordinación. Por todos los de ese laboratorio (Abraham, Cesar, Mary, Genaro, Elisa, Olivia y Diego), con los cuales me permitiste pasar momentos gratos en ese edificio de medicina. Especialmente por la vida de Abraham y todo su apoyo incondicional y desinteresado para poder terminar este trabajo, aun cuando estábamos perdidos. Y gracias por Nelson porque aunque el tiempo ha sido largo le has dado la paciencia y comprensión necesaria para llegar hasta este momento en una buena y agradable relación de compañerismo.

Gracias, por permitirme la gran bendición de estar en familia amistad cristiana, en donde he podido conocer personas sabias, desinteresadas, confiables y tantas otras virtudes que has depositado en cada una de ellas. Por Martha, Nax, Silvia; Mancha, Steph, David y Liz, Gus y Caro, Chucho y Lupita, en quienes he podido conocer y aprender ese amor incondicional para servirte. Por Miriam, Julio, Adahia, Gabi, Memo, Raquel, Paty, Ruth, Aline, Yisel, Jaz, Abi, y por Jonathan. Y por esa gran bola de escuincles que hoy en día sigo molestando y que me has permitido ver en muchos de ellos una familia en esta ciudad, Jorge, Abdiel, Mire, Angi, Arlet, Mario, Kike, Lalo,

Areli, Eme, Miguel, Hugo, Chava, Edgar, Chema, mas los que estén por llegar aun.
Gracias.

GRACIAS TE DOY A TI DIOS POR TODO, POR TE ESPIRITU SANTO Y EL
GRAN AMOR DE TU HIJO JESUS. GRACIAS.

Hay una canción que encierra algunas cosas que significan algunas personas de
mi familia y amigos:

No son muchos pero Dios los puso ahí,
Un poquito más cercanos me los regalo a mí.
Para hacerme comprender un poco más
El calibre del amor de mi Padre celestial.

No son muchos pero no los hay mejores en la tierra
Sin temor a los leones en la arena,
Solo pendientes de que alguien me proteja
Aunque el precio sea mayor.

Son amigos, y no tengo que dar nombres o apellidos
Porque ellos mismos ya se saben aludidos.

No son muchos pero Dios los puso ahí,
Extranjeros de otra talla, tan insólitos aquí.
Me respetan y regañan a la vez.
Y me quieren como soy
Aunque me conocen bien.

Están cerca, no me es fácil engañarles
Porque llevan mis heridas y miserias en su pecho
Aunque jamás me echan en cara lo que han hecho
Aun teniendo una razón.

Son amigos, no hace falta dar sus nombres o apellidos
Porque de sobra ellos se saben aludidos.

No son muchos pero Dios los puso ahí,
Peregrinos incansables, luchadores de marfil.
Forasteros con nostalgia del hogar
En sus frentes brilla el sol
En sus manos siempre hay pan.

En sus labios no hay engaño ni hay traición,
Porque son sellos
Y jamás he visto zánganos más bellos
Ni me he reído tanto como junto a ellos,
Aun en medio del dolor.

Son amigos, y no tengo que dar nombres ni apellidos
Ellos lo saben y se dan por aludidos.

(Marcos Vidal).

NELSON:

Dedico la labor plasmada en mi tesis como resultado de mi esfuerzo y del apoyo de personas especiales e importantes en mi vida. Agradezco a:

Mis padres Nicasio y Guadalupe por el hecho de concebirme, criarme e impulsarme en mi la meta de finalizar mi vida profesional. Los quiero mucho.

Mis hermanos Mayra, Edgar y Waldemar por su cariño, paciencia y amor.

Mis tíos Arturo, Elizabeth y Familia por su gran apoyo al brindarme su hogar, cariño, amor y paciencia que eliminaron en mi la soledad.

Con mucho cariño y amor a Diana y Rodrigo que son y serán la motivación de mi existencia por quienes voy a seguir luchando para ofrecerles lo mejor.

Mis profesores de quienes recopile lo mejor de sus enseñanzas, en especial a Liz Janeth y Luis Jesús que me dieron la oportunidad de brindarme su guía y amistad.

A mis amigos Martha, Paty, Montze, Abelardo, Luis, Rubén, Gisela, Abraham, Mary, Cesar, Vero, Elisa, Oly, sin olvidarme de todos los demas que compartieron conmigo su amistad y cariño que aun ahora extraño.

A mi querida Familia Bruluagsa que me ha cobijado y brindado la oportunidad de crecer como profesionista pero sobre todo como persona, gracias por la paciencia, apoyo y cariño de cada uno de ustedes.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	4
2. GENERALIDADES.....	5
2.1. DEFINICIONES.....	5
2.2. CEFALOSPORINAS.....	5
2.3. CEFALEXINA.....	7
2.3.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.....	7
2.3.2. DESCRIPCIÓN FÍSICA.....	7
2.3.3. ACCIÓN FARMACOLÓGICA Y MECANISMOS DE ACCIÓN.....	7
2.3.4. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA.....	8
2.3.5. INDICACIONES DE USO.....	9
2.3.6. DOSIS RECOMENDADA.....	10
2.3.7. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS.....	10
2.3.8. REACCIONES ADVERSAS.....	10
2.3.9. CONDICIÓN DE ANAQUEL.....	11
2.3.10. PRESENTACIONES FARMACÉUTICAS COMERCIALES.....	11
2.3.11. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	13
2.4. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	14
2.5. RESUMEN DE MÉTODOS REPORTADOS.....	15
2.6. VALIDACIÓN.....	17
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	18
3.1. MATERIALES, EQUIPOS E INSTRUMENTOS.....	18
3.2. REACTIVOS.....	18
3.3. SUSTANCIA DE REFERENCIA.....	19
3.4. FLUÍDO BIOLÓGICO.....	19
3.5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	19
3.5.1. SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE CEFALEXINA.....	19
3.5.2. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO DE SODIO 0.02 M pH 7.0.....	19
3.5.3. PREPARACIÓN DE CURVA PATRÓN.....	20
3.6. OPTIMIZACIÓN DEL METODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFALEXINA EN PLASMA.....	20
3.6.1. CONDICIONES DEL DETECTOR.....	20
3.6.2. ELECCIÓN DE COLUMNA CROMATROGRÁFICA.....	21
3.6.3. FASE MÓVIL.....	21
3.6.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	21
3.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CEFALEXINA EN PLASMA.....	22
3.7.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	22
3.7.2. PRESICIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO.....	22
3.7.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	23
3.7.4. LÍMITE DE DETECCIÓN.....	23
3.7.5. SELECTIVIDAD.....	23
3.7.6. RECOBRO.....	24
3.7.7. ESTABILIDAD.....	24

3.7.8. TOLERANCIA.....	25
3.8. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO.....	25
3.8.1. TIPO DE ESTUDIO.....	25
3.8.2. SELECCIÓN DE SUJETOS.....	26
3.8.3. PROCEDIMIENTO.....	26
3.9. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	28
3.9.1. CRITERIOS DE VALIDEZ DE LA CORRIDA.....	29
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	30
4.1. OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CEFALEXINA EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	30
4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFALEXINA EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	32
4.2.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	32
4.2.2. PRESIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO.....	32
4.2.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	33
4.2.4. LÍMITE DE DETECCIÓN.....	36
4.2.5. SELECTIVIDAD.....	36
4.2.6. RECOBRO.....	37
4.2.7. ESTABILIDAD.....	38
4.2.8. TOLERANCIA.....	43
4.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	44
5. CONCLUSIONES.....	50
6. BIBLIOGRAFÍA.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE CEFALEXINA.....	14
Tabla 2. PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN Y CONTROLES EN PLASMA....	20
Tabla 3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	30
Tabla 4. PRUEBA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR CEFALEXINA EN PLASMA (CONCENTRACIÓN RECUPERADA).....	32
Tabla 5. REPETIBILIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CEFALEXINA EN PLASMA.....	34
Tabla 6. REPRODUCTIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFALEXINA EN PLASMA EN TRES DÍAS DIFERENTES.....	35
Tabla 7. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFALEXINA EN PLASMA ENTRE ANALÍSTAS EN TRES DIAS DIFERENTES.....	35
Tabla 8. RECOBRO DE CEFALEXINA EN PLASMA HUMANO.....	38
Tabla 9. ESTABILIDAD DE CEFALEXINA EN CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.....	39
Tabla 10. ESTABILIDAD DE CEFALEXINA A TEMPERATURA AMBIENTE.....	40
Tabla 11. ESTABILIDAD DE CEFALEXINA EN REFRIGERACIÓN.....	41

Tabla 12. ESTABILIDAD DE CEFALEXINA EN CONGELACIÓN.....	42
Tabla 13. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA DE CEFALEXINA.....	43
Tabla 14. EVALUACION DE LA TOLERANCIA.....	44
Tabla 15. SEGUIMIENTO DE LAS MUESTRAS DE CONTROL DE CALIDAD PARA CEFALEXINA.....	45
Tabla 16. SEGUIMIENTO DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA CEFALEXINA.....	46
Tabla 17. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS PROMEDIO PARA.....	47
Tabla 18. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PROMEDIO PARA CEFALEXINA OBTENIDOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL EN VOLUNTARIOS SANOS.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la Cefalexina.....	7
Figura 2. Diagrama del método.....	31
Figura 3. Linealidad del método para cuantificar Cefalexina en plasma.....	33
Figura 4. Cromatogramas de selectividad del método para la.....	37
Figura 5. Grafica de valores promedio de Cefalexina en plasma después de una administración única de una dosis oral de 500mg.....	47
Figura 6. Grafica de logaritmo de los valores promedio de Cefalexina en plasma después de una administración única de una dosis oral de 500mg.....	48

APENDICES

APENDICE I

DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL.....	55
--	----

APENDICE II

RESULTADOS DEL ANALISIS COMPARATIVO PARA DETERMINAR POSIBLES DIFERENCIAS ENTRE ANALISTAS.....	58
--	----

APENDICE III

PARAMETROS FARMACOCINETICOS.....	62
----------------------------------	----

APENDICE IV

CONCENTRACIONES ($\mu\text{g}/\text{mL}$) DE SUSPENSIÓN DE CEFALEXINA PARA CADA VOLUNTARIO A TIEMPOS DETERMINADOS.....	86
---	----

APENDICE V

EVALUACIÓN ESTADISTICA.....	87
-----------------------------	----

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La Cefalexina es un antibiótico cefalosporínico semisintético de primera generación, que actúa mediante la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, actuando sobre enzimas transpeptidasas, impidiendo la formación de peptidoglicano produciendo la muerte bacteriana por shock osmótico.

Este antibiótico tiene actividad antimicrobiana con tendencia a ser mayor sobre los microorganismos grampositivos que sobre los gramnegativos, y aunque se utiliza habitualmente en el tratamiento de infecciones provocadas por microorganismos susceptibles a éste fármaco, no se ha determinado la biodisponibilidad de este fármaco en población mexicana.

Por lo anterior es importante optimizar métodos analíticos para la detección y cuantificación de Cefalexina en plasma, encontrando las condiciones favorables para un análisis óptimo que permitan un alto grado de seguridad en los resultados.

Con base en lo anteriormente mencionado; se llevo a cabo el presente trabajo, cuyos objetivos fueron los siguientes:

- Optimizar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para cuantificar Cefalexina en plasma.
- Aplicar la metodología analítica validada en un estudio de biodisponibilidad de Cefalexina.

1. GENERALIDADES

1.1. DEFINICIONES

La *biodisponibilidad* es la proporción del fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo.⁽¹⁾

La *farmacocinética* es el estudio de cómo el organismo absorbe, distribuye, metaboliza y excreta los fármacos. La exposición a los fármacos puede ser intencionada, como cuando se prescribe alguno para tratar una enfermedad, o involuntaria, como consecuencia de ingerir alimentos, agua o aire contaminados con dichos fármacos. Las investigaciones farmacológicas sobre la acción terapéutica de un medicamento han encontrado una relación entre la respuesta farmacológica o tóxica, y la medible, utilizando para ello la concentración plasmática. En este tipo de estudios suelen emplearse métodos cuantitativos y análisis matemáticos para comparar las concentraciones de los fármacos en plasma una vez administrada una dosis.⁽²⁾

La palabra *fármaco* se usa más comúnmente para describir las sustancias empleadas como medicamento para el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, la palabra fármaco se emplea para designar cualquier compuesto biológicamente activo.⁽²⁾

En los estudios farmacocinéticos se puede administrar un fármaco por diferentes vías. La más frecuente es la oral. El fármaco es deglutido y viaja hacia el intestino. Allí tiene que desintegrarse si es una tableta o cápsula, antes de disolverse en los líquidos intestinales para difundirse a través de la mucosa intestinal y ser absorbido hacia el torrente circulatorio. El fármaco se distribuye después, en función del flujo sanguíneo y de otros factores de cada región específica, las diferentes partes del cuerpo y difunde desde la sangre hacia los tejidos. Según su naturaleza, el fármaco puede ser después metabolizado o permanecer inalterado en el organismo. El metabolismo puede lograr que un fármaco sea menos (o más) activo que el fármaco original. La excreción se lleva a cabo principalmente a través del riñón, pero puede tener lugar por varias vías, dependiendo del fármaco. De esta manera, la actividad terapéutica es el resultado de una serie de etapas consecutivas a la administración de un medicamento, las cuales dependen de las características del principio activo, la vía de administración y del individuo al que se le administra.⁽²⁾

Un *antibiótico* (del griego, anti, 'contra'; bios, 'vida'), es cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Una propiedad común a todos los antibióticos es la toxicidad selectiva: la toxicidad es superior para los organismos invasores que para los animales o los seres humanos que los hospedan. En un principio, el término antibiótico sólo se utilizaba para referirse a los compuestos orgánicos producidos por bacterias u hongos que resultaban tóxicos para otros microorganismos. En la actualidad también se emplea para denominar compuestos sintéticos o semisintéticos.⁽²⁾

1.2. CEFALOSPORINAS

Las cefalosporinas son antibióticos beta-lactámicos (β -lactámicos) aislados en 1948 por G. Brotzu, quien aisló del hongo *Cephalosporium acremonium*, las primeras cefalosporinas denominadas P, N y C. Después de aislar el núcleo activo de la cefalosporina C, el ac, 7-aminocefalosporánico, y con adición de cadenas laterales fue posible producir compuestos semisintéticos con acción antibacteriana, mucho mayor que la de la sustancia original. Su mecanismo de acción es similar al de las penicilinas. En los últimos 15 años, como resultado de la investigación se han desarrollado muchas nuevas cefalosporinas, las cuales se clasifican por generaciones. Las generaciones están diferenciadas en términos de actividad antimicrobiana individual.⁽³⁾

Su estructura química es similar a la de las penicilinas (PNC), tienen un anillo lactámico igual al de la PNC, pero además tienen uno distinto, que es el anillo dihidrotiazídico, que da la posibilidad de hacer sustituciones para obtener nuevos compuestos en 2 sitios: carbono 7 y carbono 3. Las sustituciones en el carbono 7 producen cambios en el espectro de acción de las cefalosporinas, la incorporación de ciertos grupos en este carbono origina compuestos resistentes a las β -lactamasas. Sustituciones en el carbono 3 generan diferencias en la farmacocinética, lo que hace que algunas cefalosporinas puedan ser administradas por vía oral, mientras otras sólo se pueden administrar vía parenteral.⁽³⁾

Los sitios de acción para las cefalosporinas son enzimas conocidas como proteínas de unión a la penicilina (PUP). La afinidad de ciertas cefalosporinas por la PUP en varios microorganismos ayuda a explicar los diferentes espectros de actividad en esta clase de antibióticos.⁽⁴⁾

La resistencia bacteriana a los antibióticos β -lactámicos se confiere en forma más importante por la producción de enzimas β -lactamasa (tanto por las bacterias grampositivas como gramnegativas) que destruyen el anillo β -lactama e inactivan a las cefalosporinas; la disminución de la permeabilidad de la pared celular y la alteración a la afinidad de unión a la PUP también contribuyen a la resistencia bacteriana.⁽⁴⁾

Las cefalosporinas de primera generación tales como, la Cefalexina, actúan contra un gran número de cocos grampositivos, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* productores de penicilinas; *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos del grupo B, y estreptococos beta hemolíticos del grupo A; entre los microorganismos gramnegativos susceptibles se encuentran *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Shigella sp.*⁽⁴⁾

1.3. CEFALEXINA

1.3.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

A continuación se presentarán las características fisicoquímicas de la Cefalexina, así como su estructura química.

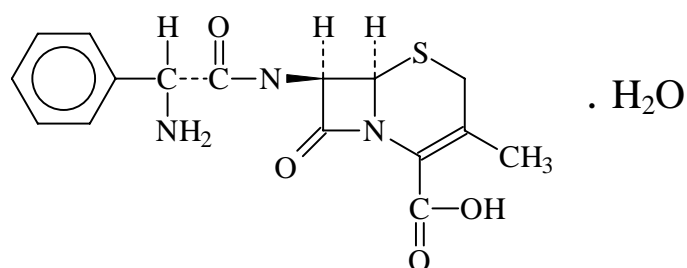


Figura 1. Estructura química de la Cefalexina.⁽³⁾

- Nombre químico: 7 -alfa-delta-fenilglicinamino-3 -metil- 3 cefen - 4- ácido carboxílico monohidrato.⁽³⁾
- Fórmula condensada: $C_{16}H_{17}N_3O_4S \cdot H_2O$ ⁽⁵⁾
- Peso Molecular = 365.4 g/mol⁽⁵⁾
- pKa 2.5, 5.2 y 7.3 ⁽⁵⁾
- Longitud de onda máxima: 260 nm.⁽⁵⁾

1.3.2. DESCRIPCIÓN FÍSICA

Cristales blancos; de olor característico, pH (de una solución al 0.5 %) es de aproximadamente 4.5. Un gramo se disuelve en 100 mL de agua; es soluble en soluciones alcalinas acuosas diluidas; es muy poco soluble o prácticamente insoluble en solventes orgánicos.⁽⁶⁾

1.3.3. ACCIÓN FARMACOLÓGICA Y MECANISMO DE ACCIÓN

En contraste con las células animales, las bacterias poseen una capa rígida, la pared celular, que conserva la forma de los microorganismos y encierra a la célula bacteriana, la cual tiene una presión osmótica interna alta. Esta presión osmótica interna es de tres a cinco

veces mayor en los microorganismos grampositivos en relación con las bacterias gramnegativas. La lesión a la pared celular (por ejemplo, por las lisozimas) o la inhibición de su formación puede conducir a la lisis de las células.⁽⁴⁾

La pared celular contiene un “mucopéptido”, polímero complejo diferente (“mureína”, “peptidoglicán”) que consiste de polisacáridos y un polipéptido con muchos enlaces (eslabones) transversos. El polisacárido contiene regularmente a los aminoazúcares N-acetilglucosamina y ácido acetilmurámico. Este último se encuentra solamente en las bacterias. A los aminoazúcares van ligadas cadenas pentapeptídicas. La rigidez final de la pared celular es impartida mediante enlaces cruzados de las cadenas peptídicas como resultado de las reacciones de transpeptidación ejecutadas por diversas enzimas. La envoltura de peptidoglucano es mucho más gruesa en la pared celular de las bacterias grampositivas que en la pared celular de las bacterias gramnegativas.⁽⁴⁾

Después de que un medicamento β -lactámico se ha adherido a su receptor o receptores, la reacción de transpeptidación es inhibida y la síntesis del peptidoglucano es bloqueada. El paso siguiente probablemente sea la eliminación o la inactivación de un inhibidor de las enzimas autolíticas de la pared celular. Esto activa a la enzima lítica y origina lisis de la célula si el medio es isotónico. En un medio notablemente hipertónico, los microorganismos se transforman en protoplastos o esferoplastos, cubiertos sólo por una frágil membrana celular. En estas células puede continuar por algún tiempo la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.⁽⁴⁾

La inhibición de la enzima de transpeptidación por cefalosporinas, puede ser debida a la semejanza estructural de estos medicamentos con la acil-D-alanil-D-alanina. La reacción de transpeptidación implica la pérdida de una D-alanina del pentapéptido. La diferencia de la sensibilidad de las bacterias grampositivas y de las gramnegativas ante diferentes penicilinas o cefalosporinas dependen probablemente de las diferencias estructurales en sus paredes celulares (es decir, cantidad de peptidoglucano, presencia de receptores y de lípidos, naturaleza del eslabonamiento entrecruzado y la actividad de las enzimas autolíticas) lo cual determina la penetración, enlace y actividad de los medicamentos. ⁽⁴⁾

1.3.4. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

La Cefalexina es un ácido débil que administrado por vía oral se absorbe en el intestino rápida y completamente, en un grado variable, por lo que es la vía de administración de elección de este fármaco. Este antibiótico se absorbe más lentamente por vía intramuscular que por vía oral y los niveles obtenidos son mas bajos y prolongados.⁽⁷⁾

La Cefalexina se distribuye por vía oral y tiene el mismo espectro antibacteriano que las demás cefalosporinas de la primera generación; sin embargo, es un poco menos activa contra estafilococos productores de penicilasa. La Cefalexina no es metabolizada por el organismo y se excreta inalterada por la orina entre 70 y 100%. ⁽⁷⁾

La velocidad de absorción depende de la forma farmacéutica. Después de una dosis oral (capsulas o tabletas) de 500 mg, las concentraciones séricas máximas son de 15 a 20 µg/mL aproximadamente. Administrada esta dosis en forma de suspensión la Cefalexina aparece en plasma después de 9 minutos comparada con los 38 minutos cuando se administra en forma de cápsulas esto debido a que en suspensión el principio activo se encuentra debidamente disperso siendo que en tabletas y cápsulas no lo está. Cuando se administra por vía oral en dosis de 0.25 a 0.5 g cuatro veces al día (15-30mg/kg/día), la concentración máxima se alcanza en una hora; la ingesta de alimentos retarda, pero no inhibe la absorción completa.⁽⁷⁾

Se distribuye ampliamente en la mayor parte de tejidos y líquidos del cuerpo, incluyendo vesícula biliar, hígado, riñones, huesos, esputo, bilis y líquido pleural y sinovial, aunque se sabe que las concentraciones mayores de fármaco son en hígado y riñón. Tiene una unión a proteínas de 6 a 15%.⁽⁷⁾

Una gran ventaja de este fármaco es que no se metaboliza, evitando de esta manera el efecto del primer paso; se pueden detectar niveles plasmáticos hasta 6 horas después de la administración.⁽⁷⁾

La excreción es principalmente vía renal, mediante secreción tubular y por filtración glomerular; se han encontrado reportes de valores de depuración alrededor de 15120 y 14880 mL/hora. Los fármacos bloqueadores de la secreción tubular, por ejemplo el probenecid, pueden incrementar de manera sustancial las concentraciones séricas, por lo que en pacientes con insuficiencia renal, las dosis deben ajustarse.⁽⁷⁾

La vida media de eliminación es de cerca de ½ a 1 hora en pacientes con función renal normal y de 7 ½ a 14 horas en pacientes con deterioro renal avanzado. La hemodiálisis o diálisis peritoneal elimina la Cefalexina de la circulación sistémica.⁽⁷⁾

1.3.5. INDICACIONES DE USO

La Cefalexina está indicada para el tratamiento de infecciones del aparato urogenital, inclusive prostatitis, por *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella sp.*, infecciones de la piel y del tejido de las partes blandas por *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, o ambos, infecciones de los huesos y articulaciones, inclusive osteomielitis por *Staphylococcus sp.*, *Proteus mirabilis* o ambas, infecciones de las vías respiratorias por *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus β-hemolíticos* del grupo A, otitis media y faringitis por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, y *Nisseria catarrhalis* y en odontología en infecciones por *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* o ambos.⁽⁸⁾

1.3.6. DOSIS RECOMENDADAS

Dosis oral para adultos, 250 a 1000 mg cada 6 horas, excepto en las infecciones de la piel y los tejidos blandos para las que se administrarán dosis de 500 mg cada 12 horas; dosis para niños con otitis media, 18.8 a 25 mg/Kg cada 6 horas y para niños con infecciones de la piel y los tejidos blandos, 12.5 a 50 mg/Kg y para niños con otras infecciones, 6.25 a 25 mg/Kg cada 6 horas.⁽⁶⁾

1.3.7. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Antes de indicar el uso Cefalexina deben investigarse reacciones de hipersensibilidad previas a cefalosporinas o penicilinas, ya que este antibiótico esta contraindicado a estas personas. Se han descrito reacciones parciales cruzadas de hipersensibilidad con las penicilinas. El tratamiento con antibióticos de amplio espectro puede alterar la flora del colon y permitir el crecimiento de *Clostridium difficile*, cuya toxina produce diarrea asociada con colitis pseudomembranosa. Se han informado pruebas de Coombs positivas. La Cefalexina debe ser administrada con cuidado en pacientes con insuficiencia renal. Con el uso de Cefalexina pueden encontrarse resultados falsos-positivos en las pruebas de glucosa en orina.⁽⁹⁾

No es conveniente prolongar la terapia más allá de los 30 días. Pueden producirse infecciones por supresión de la flora normal.⁽⁹⁾

Los experimentos en animales de laboratorio y la experiencia clínica no ha mostrado evidencias de teratogenicidad, pero como todos los fármacos, la Cefalexina debe ser administrada con precaución durante el embarazo.⁽⁹⁾

1.3.8. REACCIONES ADVERSAS

Una pequeña proporción de los pacientes en terapia con Cefalexina pueden experimentar trastornos gastrointestinales tales como: náuseas, vómitos y colitis pseudomembranosa; más frecuentemente diarrea, dolor abdominal, dispepsia, gastritis e ictericia. También pueden presentarse reacciones de hipersensibilidad como: rash, urticaria, angioedema y raramente eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, epidermólisis tóxica y anafilaxia. Otras reacciones colaterales informadas son prurito anal y genital, mareos, cefalea y alucinaciones; artralgias, nefritis intersticial, eosinofilia, neutropenia, trombocitopenia y elevación transitoria de transaminasas.⁽⁹⁾

1.3.9. CONDICIÓN DE ANAQUEL

Conservar en lugar fresco, seco y pretejer de la luz solar. Si la forma farmacéutica es para resuspender una vez hecha la suspensión esta se debe conservar en refrigeración por el tiempo indicado en etiqueta.

1.3.10. PRESENTACIONES FARMACÉUTICAS COMERCIALES

CEPOREX

Cápsulas, tabletas y suspensión
(Cefalexina)

FORMA FARMACEUTICA Y FORMULACION

Cada cápsula contiene:

Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a250 y 500 mg
de Cefalexina
Excipiente, c.b.p. 1 cápsula.

Cada tableta contiene:

Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a1.0 g
de Cefalexina
Excipiente, c.b.p. 1 tableta.

Cada 5 mL de suspensión contiene:

Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a125 y 250 mg
de Cefalexina
Vehículo, c.b.p. 5 mL.

GLAXOWELLCOME MÉXICO, S.A. de C.V.⁽⁹⁾

KEFLEX

Cápsulas, tabletas y suspensión
(Cefalexina)

FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN

Cada cápsula contiene:

Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a250 y 500 mg
de Cefalexina

Excipiente, c.b.p. 1 cápsula.

Cada tableta contiene:

Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a500 mg y 1.0 g
de Cefalexina

Excipiente, c.b.p. 1 tableta.

Cada 5 mL de suspensión contiene:

Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a125 y 250 mg
de Cefalexina

Vehículo, c.b.p. 5 mL.

ELI LILLY Y CÍA DE MÉXICO, S.A de C.V.⁽⁹⁾

NIXELAF-C

Cápsulas y suspensión
(Cefalexina)

FORMA FARMACEUTICA Y FORMULACIÓN

Cada cápsula contiene:

Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a250 y 500 mg
de Cefalexina

Excipiente, c.b.p. 1 cápsula.

Cada 5 mL de suspensión contiene:

Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a125 y 250 mg
de Cefalexina

vehículo, c.b.p. 5 mL.

BRULUAGSA, S.A de C.V.⁽⁹⁾

PAFERXIN

Cápsulas
(Cefalexina)

FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN:

Cada cápsula contiene:

Monohidrato de Cefalexina,

equivalente a250 y 500 mg
de Cefalexina
Excipiente c.b.p. 1 cápsula.

LIFERPAL MD, S.A. de C.V.⁽⁹⁾

SERVICEF

Cápsulas y suspensión
(Cefalexina)

FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN:

Cada cápsula contiene:
Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a250 y 500 mg
de Cefalexina
Excipiente c.b.p. 1 cápsula.

Cada 5 mL de suspensión contiene:
Monohidrato de Cefalexina,
equivalente a125 mg
de Cefalexina
vehículo, c.b.p. 5 mL.

NOVARTIS FARMACÈUTICA, S. A. DE C. V.⁽⁹⁾

1.3.11. MÉTODOS ANALÍTICOS

A continuación se presentan algunos de los métodos analíticos encontrados en la literatura, para la cuantificación de Cefalexina.

- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.

La eficacia de los antibióticos, desde el punto de vista terapéutico, se puede demostrar por la inhibición que ejerce sobre los microorganismos específicos bajo condiciones especiales. La valoración se puede llevar a cabo por 2 métodos: el de difusión o cilindro placa y el de dilución, utilizando los siguientes medios de cultivo (Tabla 1):

Tabla 1 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE CEFALEXINA

Microorganismo De prueba	Medio de Cultivo
Staphilococcus aureus (ATCC 29737)	Peptona, digerido pancreático de caseína, carne de res, dextrosa y agar.
Sarcina lutea (ATCC 8340) y Bacillus subtilis (ATCC6633)	Mezcla de peptona-agar, citrato de sodio.

El método de cilindro placa se basa en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical sobre una capa de agar solidificado que contiene el microorganismo de prueba. La zona de inhibición es un área circular que se encuentra alrededor del cilindro que contiene la solución del antibiótico.⁽¹⁰⁾

- MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV.

Todas las cefalosporinas inalteradas presentan una absorción a 260nm debido al enlace $O=CNC=C$ del anillo beta-lactámico. Esta absorción desaparece al romperse el anillo beta-lactama ya sea por una acción química o enzimática.⁽¹¹⁾

- MÉTODO IODOMÉTRICO.

La valoración de yodo representa la cantidad de yodo absorbida por una cantidad de muestra. Este método se utiliza tanto para la determinación de cefalosporinas inalteradas como para las penicilinas, mostrando que hay una correlación lineal entre el consumo de yodo y la concentración de cefalosporinas.⁽¹¹⁾

1.4. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

En la actualidad la cromatografía se refiere a una diversidad de técnicas que realizan una separación por la distribución de la muestra dentro de dos fases inmiscibles.⁽¹²⁾

La separación del analito de las posibles interferencias es a menudo una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos. La cromatografía en columna fue descubierta y denominada así, a principios del siglo XX por el botánico ruso Mikhail Tswett. Él empleó la técnica para separar pigmentos vegetales, tales como clorofilas y xantofilas. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna lo que justifica el nombre que

eligió para el método (del griego chroma que significa <<color>> y graphein que significa <<escribir>>).(12)

En la práctica, la muestra se desplaza con una fase móvil que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, ya sea un líquido o un sólido que se fija a una columna o a una superficie. La separación de los componentes, o solutos de una muestra resulta por la diferencia de ellos en razón de la adsorción, solución o reacción con la fase móvil o estacionaria. La naturaleza de la fase móvil y estacionaria, el tipo de interacción entre las dos fases y el soluto y la disponibilidad física de la fase estacionaria tienden a distinguir los diferentes tipos de cromatografía. La cromatografía permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. (13)

Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. El lapso de tiempo que tarda el solvente en ser detectado, se denomina t_M (tiempo muerto). Mientras que el tiempo que transcurre desde que la muestra es introducida al sistema cromatográfico hasta que alcanza su punto máximo de concentración, se le denomina t_R (tiempo de retención).(13)

Después que la muestra sale de la columna, pasa a través de un detector, el cual es capaz de responder a alguna de las propiedades del soluto, originando una señal que va a ser registrada en un gráfico llamado cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra, su tiempo de retención o su posición en la fase estacionaria tras un cierto período de elusión; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente. Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores que se basan en la medida de una propiedad de la disolución responden a una propiedad del efluente, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por el contrario los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia en el UV, fluorescencia, o corriente límite, que no son inherentes a la fase móvil. (13)

1.5. RESUMEN DE MÉTODOS REPORTADOS

Algunos de los métodos analíticos en los cuales nos basamos como apoyo tanto para la parte de extracción y condiciones cromatográficas, como también para la comparación de algunos parámetros farmacocinéticos se citan a continuación.

McAteer, et. al. reportaron un procedimiento para la separación de cinco cefalosporinas de administración oral (cefixime, cefaclor, cefadroxilo, cefalexina y cefadrin) en 0.1 mL de suero humano. Las proteínas del suero fueron precipitadas con acetonitrilo, la muestra se centrifugó, la solución se evaporó con nitrógeno. Los residuos fueron reconstituidos en 0.1 mL de fase móvil, el volumen de inyección fue de 50 a 80 μ L en una fase reversa con una columna Altex Ultrasphere™ Octal (C₈). Las cinco cefalosporinas fueron separadas por elución con una fase móvil de metanol/solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio (20:80 v/v) a pH 2.6, a una velocidad de flujo de 2 mL/min. El efluente de la columna fue monitoreado a 240 nm. El tiempo de retención para cefalexina en estas condiciones fue de 15 minutos aproximadamente, obteniéndose un recobro promedio de 82.3%. El límite de detección para cefixime fue de 0.1 mg/L y para las otras cefalosporinas de 1 mg/L. Los coeficientes de variación día a día fueron menores al 15 % para todos los compuestos estudiados⁽¹⁴⁾.

Welling, et. al. compararon la farmacocinética de cefalexina y cefadroxilo después de la administración de una dosis única de 500 mg por vía oral a 12 voluntarios sanos de sexo masculino. La dosis fue administrada en ayunas acordando una designación cruzada. Los niveles en plasma y orina de estos compuestos fueron determinados por CLAR. La cefalexina fue absorbida rápidamente, el nivel en plasma alcanza 17.5 μ g/mL a 1 hora, comparado a 16 μ g/mL a 1.8 horas del cefadroxilo. La vida media de eliminación de cefalexina y cefadroxilo fue de 0.7 y 1.1 horas respectivamente. La curva en plasma de cefadroxilo fue significativamente más larga que para Cefalexina.⁽¹⁵⁾

Lecaillon, et. al. determinaron los parámetros farmacocinéticos de cefroxadin y Cefalexina después de la administración oral de estas dos cefalosporinas a 21 sujetos. La influencia de la dosis, la formulación y el alimento fueron admitidos dentro de los parámetros de investigación. Ambos fármacos fueron bien absorbidos en las diferentes presentaciones. El porcentaje de recobro se realizó en muestras de orina en todos los casos. El tiempo de vida media de eliminación de cefroxadin y consecuentemente, la cantidad en plasma (determinada mediante una curva concentración vs tiempo) fue cerca del 10% menos que de Cefalexina. Las curvas de concentración en plasma y la excreción acumulada de los dos fármacos casi se superponen. La comida modificó algunos parámetros de ambas drogas; la absorción fue lenta, pero la cantidad absorbida fue casi la misma para todos los sujetos.⁽¹⁶⁾

Otro método en el cual nos basamos fue en el reportado por Martín, et. al., los cuales determinaron amoxicilina y ac. clavulánico en plasma y tejidos en 17 pacientes. Aunque su estudio no fue realizado con cefalexina, se tomó en cuenta debido a que ambas tienen características semejantes.⁽¹⁷⁾

Para determinar amoxicilina en plasma, se ocuparon 500 μ L de la muestra que fueron estabilizados con 500 μ L de acetato de amonio 0.2M (pH 7.0). Se agitó 30 seg en vortex y fue desproteinizada con 1.0 mL de acetonitrilo. Después de agitar 15 seg y centrifugar 10 min. a 3000 rpm el acetonitrilo fue removido por extracción con 3.0 mL de diclorometano. La

solución fue agitada en vortex 30 seg y centrifugada durante 5 min a 3000 rpm. La fase acuosa (50 μ L) fue inyectada a un sistema CLAR.⁽¹⁷⁾

La determinación por CLAR se llevo a cabo usando una precolumna (LiChrospher RP 18 E: tamaño de partícula 5 μ m; 25x4mm de diámetro interno) conectada a una columna analítica (LiChrospher RP 18 E: tamaño de poro 5 μ m; 125x4 mm de diámetro interno). La fase movil fue de acetonitrilo/solución amortiguadora de fosfato de sodio monohidratado pH 6.8. (3:97 v/v). A una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. Usando un detector UV a 225 nm. Los porcentajes de recobro fueron de 91% \pm 3.⁽¹⁷⁾

1.6. VALIDACIÓN

La validación de métodos analíticos es la evidencia experimental documentada de que un proceso cumple con el propósito para lo que fue diseñado. La validación involucra la determinación de variables críticas y los rangos aceptables de estas variables, seguidas por un continuo control de ellas. Los criterios y requisitos para la validación de este método analítico se citan en la NOM-177-SSA1-1998⁽¹⁾, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, criterios a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

1. PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental se dividió en dos partes:

1. Optimización y validación del método analítico para cuantificar Cefalexina en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
2. Análisis de las muestras de voluntarios mexicanos sanos, para cuantificar Cefalexina en plasma.

1.1. MATERIALES, EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Waters que consta de:
 - o Bomba cuaternaria con desgasificador en línea, modelo 600 Controlled, Waters.
 - o Integrador paquete computacional Empower, Waters.
 - o Detector de arreglo de diodos, modelo 996 Waters.
 - o Automuestreador, modelo 717 Plus de Waters
- Vortex Thermolyne Maxi mix II
- Centrifuga Sorvall modelo SS-3
- Balanza analítica OHAUS modelo AS-120
- Potenciómetro OAKTON pH 1000 series
- Agitador Fisher Stirring Hotplate
- Sonicador Cole-Palmer 8890
- Equipo para filtración Millipore con membrana de 0.45 μm
- Micropipeta Eppendorf de 100 - 1000 μL
- Micropipeta Eppendorf de 10 - 100 μL
- Repetidora Eppendorf Repeater plus.
- Ultracongelador Harris II.

1.2. REACTIVOS

- Acetonitrilo, grado HPLC, Prolabo.
- Agua desionizada, grado HPLC.
- Fosfato de sodio dibásico anhidro, Sigma.
- Ácido fosfórico, pureza: 85 %, R.A. Merck.
- Diclorometano, pureza: 100%, Fisher-Scientific.
- Ac. Acetilsalicílico. Materia prima.
- Paracetamol. Materia prima.
- Tubo vacutainer heparinizado.

1.3. SUSTANCIA DE REFERENCIA

- Sustancia de referencia secundaria, monohidrato de Cefalexina. Helm de México, con una pureza del 93.38%, lote 2383240.

1.4. FLUÍDO BIOLÓGICO

El fluido biológico utilizado en este estudio fue plasma humano fresco congelado, con etiqueta de sangre segura y con resultado negativo a las pruebas de VIH, hepatitis B y VDRL. Este plasma fue obtenido del Hospital Español.

1.5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1.5.1. SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE CEFALEXINA

- SOLUCIÓN A:

Pesar el equivalente a 0.015g de Cefalexina, esta cantidad se transfiere a un matraz volumétrico de 50 mL, se disuelve y se lleva a volumen con agua. Esta solución contiene 300 µg/mL de Cefalexina.

- SOLUCIÓN B:

Con pipeta volumétrica tomar 25 mL de la solución A, este volumen se transfiere a un matraz volumétrico de 50 mL y se lleva a volumen con agua. Esta solución contiene 150 µg/mL de Cefalexina.

- SOLUCIÓN C:

Con pipeta volumétrica tomar 10 mL de solución B, este volumen se transfiere a un matraz volumétrico de 100 mL y se lleva a volumen con agua. Esta solución contiene 15 µg/mL de cefalexina.

1.5.2. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO DE SODIO 0.02 M pH 7.0

Pesar 2.83 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, esta cantidad transferirla a un matraz volumétrico de 1 litro, disolver y llevar a volumen con agua desionizada. Ajustar el pH a 7.0 con ácido fosfórico al 85 %. Filtrar la solución al vacío a través de una membrana Millipore de 0.45 µm y desgasificar por sonicación al vacío durante 15 minutos.

1.5.3. PREPARACIÓN DE CURVA PATRÓN

En la Tabla 2 se esquematiza la preparación de los puntos correspondientes a la curva de calibración y los tres puntos control en plasma.

Tabla 1. PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN Y CONTROLES EN PLASMA

CONCENTRACIÓN DE CEFALEXINA (µg/mL)	ALÍCUOTA DE SOLUCIÓN ESTANDAR DE CEFALEXINA (µL)	SOLUCIÓN ESTANDAR EMPLEADA (µg/mL)	ALÍCUOTA O VOLUMEN DE AGUA (µL)	ALÍCUOTA O VOLUMEN DE PLASMA (mL)
30	100	B	0	0.5
24	80	B	20	0.5
18	60	B	40	0.5
12	40	B	60	0.5
6	20	B	80	0.5
3	100	C	0	0.5
2.4	80	C	20	0.5
1.8	60	C	40	0.5
1.5	50	C	50	0.5
1.2	40	C	60	0.5
0.6	20	C	80	0.5
0.3	10	C	90	0.5

1.6. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFALEXINA EN PLASMA

Durante el desarrollo de este trabajo comenzamos por la optimización de métodos en donde se cuantificaba específicamente Cefalexina ^(14, 15, 16), sin embargo ninguno de estos métodos fue viable.

Por lo anterior nos basamos en el método desarrollado por Claude Martín et. al.⁽¹⁷⁾ en donde se cuantifica un antibiótico (amoxicilina) de características similares a la Cefalexina, al cual se le realizaron las siguientes modificaciones para su optimización:

1.6.1. CONDICIONES DEL DETECTOR

Se confirmó la longitud de máxima absorción (λ) para Cefalexina realizando un barrido en la región de UV de 200 a 400 nm.

1.6.2. ELECCIÓN DE COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Se probaron tres columnas cromatográficas de características semejantes a las empleadas en las referencias citadas, la elección se hizo en base a la medición de los parámetros cromatográficos como el tiempo de retención (t_r), factor de capacidad (k') y simetría, bajo los siguientes criterios de aceptación:

- t_r de cefalexina correspondiente a un pico eluido en un área del cromatograma libre de interferencias.
- Factor de capacidad: $2 < k' < 6$, como indicador del grado de retención de la cefalexina entre la fase estacionaria y la fase móvil.
- Simetría ≤ 2.0 , como un estimador de la deformación o simetría del pico, ya que anchos de pico muy grandes pueden conducir a separaciones deficientes lo que se traduce en pérdida de resolución y límites del pico mal definidos dificultan la integración, lo que conlleva a errores en la cuantificación.

Las columnas evaluadas fueron:

- 1) Xterra MS C18 5 μm de 3.9 x 150 mm.
- 2) Waters Spherisorb 5 μm CN-RP de 4.6 x 250 mm.
- 3) YMC ODS-AQ S-5 120 \AA de 3.0 x 150 mm.

Las columnas se probaron empleando una concentración de cefalexina de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua, y una proporción de fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos 0.02M pH 7.0: acetonitrilo (98:2 v/v), a un flujo isocrático de 1mL/min. Se inyectó un volumen de 10 μL .

1.6.3. FASE MÓVIL

Se llevaron a cabo ajustes de la fase móvil, cambiando la concentración de la solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.01 M con un pH de 3.2 a una solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio 0.02 M con un pH de 7.0. La proporción fue cambiada de un 4% de Acetonitrilo y 96% de solución amortiguadora a una proporción de solución amortiguadora del 97% y 3% de Acetonitrilo, terminando en 89:11 v/v.

Se eligió aquella que definiera mejores tiempos de retención, una simetría ≤ 2.0 y una resolución (R) ≥ 2.0 . Garantizándose así una separación aceptable y una adecuada integración y cuantificación del pico de interés.

1.6.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Se llevaron a cabo ajustes en los tiempos de agitación y velocidad de centrifugación del método citado por Martín et. al. Con el fin de optimizar el tiempo de extracción.

1.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CEFALEXINA EN PLASMA

Una vez obtenidas las condiciones idóneas para la cuantificación de Cefalexina en plasma, como matriz biológica, se realizó la validación del método.

El método analítico fue validado para demostrar que cumplía con el propósito para el que fue diseñado, y así asegurar la confiabilidad de los resultados. Para ello se validó siguiendo las especificaciones de la NOM-177-SSA1-1998 ⁽¹⁾, en lo referente a la validación de métodos analíticos para realizar pruebas de bioequivalencia. Los parámetros evaluados fueron los que se describen a continuación.

1.7.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para evaluar la linealidad del método se preparó una curva patrón en plasma, en tres días de trabajo. Las curvas se prepararon a partir de soluciones patrón independientes y se consideró que el método cumplía con este parámetro si al realizar el ajuste lineal por mínimos cuadrados de la respuesta contra la concentración se obtenía un coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0.99.

Todas las curvas de calibración debían cumplir con el siguiente criterio:

Todos los puntos de la curva, debían encontrarse dentro del límite del $\pm 15\%$ con respecto a su valor nominal a excepción del límite de cuantificación que podía ser del $\pm 20\%$ y el valor del coeficiente de correlación "r" debía ser ≥ 0.99 .

La linealidad fue evaluada tratando el área de cefalexina de cada punto de la curva patrón como desconocido e introduciéndolos en la ecuación derivada por la regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener la correspondencia entre la concentración nominal o conocido y el valor de la concentración recuperada.

1.7.2. PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO.

La precisión del método fue evaluada como repetibilidad (precisión intradía) y reproducibilidad entre días y entre analistas, y fue llevada a cabo analizando tres concentraciones conocidas (puntos de control de calidad) de cefalexina en plasma, diferentes

a los de la curva patrón, pero incluidos dentro del rango, en un nivel bajo, medio y alto (1.2, 6.0 y 24 µg/mL). En el caso de la repetibilidad del método analítico, los niveles anteriores fueron analizados por quintuplicado un mismo día; mientras que para evaluar la reproducibilidad se analizaron por duplicado durante tres días y por dos analistas, bajo las mismas condiciones de análisis.

La precisión fue determinada con el coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas, el cual no debía ser mayor a 15%. Mientras que la exactitud fue definida como la desviación absoluta (Desv. abs. ±15%) del valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración (tanto para los datos de repetibilidad como de reproducibilidad) con respecto al valor nominal (cantidad adicionada), en donde:

$$Desv.abs\% = 100 \times \frac{|Cantidad\ adicionada - Cantidad\ recuperada|}{Cantidad\ adicionada}$$

La precisión y la exactitud fueron evaluadas tratando el área de cefalexina de las muestras control como desconocidas e introduciéndolas en la ecuación derivada por la regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener la correspondencia entre la concentración nominal o adicionada y la concentración recuperada.

1.7.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

La sensibilidad del método fue determinada como la concentración mínima cuantificable (CMC) ó límite de cuantificación (LC). El LC fue la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio cae dentro del ±20% del valor nominal (cantidad adicionada) con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

1.7.4. LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección (LD) fue determinado como la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica es tres veces mayor que el nivel de ruido y la precisión y la exactitud son mayores al 20%.

El límite de detección será aquella concentración a la cual la señal de cefalexina en plasma sea tres veces mayor que el nivel de ruido.

1.7.5. SELECTIVIDAD

La selectividad del método fue determinada, analizando muestras blanco de la matriz biológica (plasma) y muestras de plasma conteniendo fármacos de uso común, tales como Ácido acetilsalicílico (300 µg/mL), paracetamol (20 µg/mL) y anticoagulante (heparina), sometidas al procedimiento de extracción propuesto (ver figura 2), evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de Cefalexina.

1.7.6. RECOBRO

El recobro fue definido como el porcentaje de área de Cefalexina recuperada después de la extracción de las muestras de plasma, comparada contra el área de muestras de Cefalexina sin someterse al proceso de extracción. Se analizó por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones (puntos de control de calidad) de Cefalexina en plasma (muestras tratadas la con extracción propuesta). Se comparó el área de los picos contra aquellas obtenidas para Cefalexina en las mismas concentraciones en fase móvil (no extraídas).

1.7.7. ESTABILIDAD

La prueba de estabilidad tiene como función determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Se evaluó la estabilidad de la muestra en ciclos congelación-descongelación (2 ciclos), temperatura ambiente (0, 24 y 48 horas), refrigeración (0, 24 y 48 horas), congelación (0, 20 y 35 días); asimismo, se evaluó la estabilidad de la muestra procesada hasta las 96 horas.

Los valores obtenidos debían cumplir con el límite de $\pm 15\%$ del valor original para considerar que eran estables bajo esas condiciones durante el tiempo determinado.

a. Ciclos Congelación-Descongelación. La estabilidad de Cefalexina en plasma bajo dos ciclos congelación-descongelación a -70°C fue evaluada preparando tres series de muestras de control de calidad por duplicado conteniendo Cefalexina a las siguientes concentraciones: 1.2, 6.0 y 24 µg/mL (baja, media y alta respectivamente) las cuales fueron analizadas el día 0 y posteriormente congeladas a -70°C y descongeladas a las 24 horas. Las muestras se volvieron a congelar y fueron nuevamente descongeladas a las 48 hrs., constituyéndose 2 ciclos congelación-descongelación.

b. Temperatura Ambiente. Se realizó evaluando 3 series de los puntos de control de calidad por duplicado, de la cual una serie se procesó inmediatamente ($t = 0$) y las series restantes se

almacenaron a temperatura ambiente para analizarse a las 24 y 48 horas posteriores a su preparación.

c. Refrigeración. Se realizó evaluando 3 series de los puntos de control de calidad por duplicado, de la cual una serie se procesó inmediatamente ($t = 0$) y las series restantes fueron refrigeradas para analizarse a las 24 y 48 horas posteriores a su preparación.

d. Congelación. Se realizó evaluando 3 series de los puntos de control de calidad por duplicado, de la cual una serie se procesó inmediatamente ($t = 0$) y las series restantes fueron congeladas a -70°C y descongeladas para analizarse a los 20 y 35 días posteriores a su preparación.

e. Estabilidad de la muestra procesada. Se realizó evaluando 3 series de los puntos de control de calidad por duplicado, las cuales se sometieron al procedimiento de extracción y se inyectaron en el sistema cromatográfico a los tiempos: 0, 24 y 96 horas después de su preparación. La muestra procesada permaneció en el automuestreador a temperatura ambiente.

1.7.8. TOLERANCIA

La tolerancia evalúa la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas al método, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporcionan una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. Para ello se prepararon por duplicado y a partir de soluciones stock independientes, muestras de concentraciones 1.2, 6.0 y 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cuales se inyectaron cambiando la proporción de fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos:ACN (89:11 v/v) a (91:9 v/v) y (90:10v/v).

El método se consideró tolerante a cada cambio si no se presentaba una desviación absoluta con respecto a los valores iniciales de más del 15%.

1.8. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO

La parte clínica del estudio se realizó en la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital Español de México.

1.8.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio de dosis única de 500 mg de Cefalexina, suspensión de 250 mg/5mL, administrada por vía oral.

Ceporex, suspensión, Glaxo SmithKline, Lote: 17003163. Caducidad Marzo/06.

1.8.2. SELECCIÓN DE LOS SUJETOS

La selección de los 24 sujetos (12 hombres y 12 mujeres) clínicamente sanos se basó en:

- CRITERIOS DE INCLUSION PARA LOS VOLUNTARIOS.

- A. La participación de los sujetos fue de manera voluntaria de acuerdo con los lineamientos propuestos en la Ley General de Salud y se obtuvo su consentimiento informado de acuerdo a la ley antes señalada. Asimismo, se mantuvieron las normas marcadas por la Declaración de Helsinki revisada en Japón (Apéndice I), y las Buenas Prácticas Clínicas.
- B. Se incluyeron voluntarios sanos, con edades entre 18 y 40 años.
- C. El índice de masa corporal de los sujetos debió estar para los voluntarios sanos del sexo masculino entre 19 y 30 y para el sexo femenino entre 18.5 y 29 según Quetelet.
- D. Los voluntarios debieron tener un buen estado de salud determinado por los resultados de una historia clínica completa realizada por los médicos de la Unidad de Farmacología Clínica y los estudios de laboratorio realizados en Laboratorios Clínicos certificados.
- E. Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad en la visita de selección fueron: tensión arterial (sentado) de 90 a 130 mm Hg la sistólica y de 60 a 90 mm Hg la diastólica, frecuencia cardiaca entre 55 y 100 latidos por minuto y frecuencia respiratoria entre 14 y 20 respiraciones por minuto.
- F. Los exámenes de laboratorio y gabinete que se efectuaron para la inclusión de los sujetos al estudio fueron:
 - Hematología: hemoglobina, hematocrito, cuenta total de glóbulos blancos con diferencial y cuenta de plaquetas.
 - Química sanguínea de 24 elementos
 - Marcadores para hepatitis B y C.
 - Detección de VIH.
 - Examen general de orina.
 - Prueba de embarazo previa al inicio del estudio.
 - Electrocardiograma.

Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad para los valores de laboratorio fueron de +/- 10% del intervalo de lo normal, a menos que a criterio de la coordinación clínica o del Jefe de la Unidad la desviación no sea clínicamente significativa. Se anotaron estos valores en el expediente clínico del voluntario y se documentó la decisión de incluir al sujeto.

G. A los voluntarios se les practicó una valoración psicológica por la psicóloga de la Unidad, utilizando la prueba de Minimental, el inventario Multifásico de la personalidad Minnesota II (MMPI-2), para evaluar el perfil de personalidad de los voluntarios que se encontraron en el estudio y el IDARE (inventario de ansiedad: rasgo - estado), la elección de dichas pruebas se basa en que están validadas y son confiables para la población mexicana.

Se incluyeron los voluntarios que no presentaron datos de alguna patología mental.

- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- A. Sujetos a los que se les encontró alguna alteración en sus constantes vitales registradas en la selección de voluntarios.
- B. Voluntarios que no cumplían con los criterios de inclusión propuestos.
- C. Voluntarios con antecedentes de padecimientos cardiovasculares, renales, hepáticos, musculares, metabólicos, gastrointestinales incluyendo estreñimiento, neurológicos, endócrinos, hematopoyéticos o cualquier tipo de anemia, asma, enfermedad mental u otras anormalidades orgánicas. Así como aquellos que hayan tenido un traumatismo muscular dentro de los 21 días previos al estudio.
- D. Voluntarios que requirieran de cualquier medicamento durante el curso del estudio, además del medicamento que está siendo estudiado.
- E. Voluntarios con antecedentes de dispepsia, de gastritis, esofagitis, úlcera duodenal o gástrica.
- F. Voluntarios que hubiesen estado expuestos a fármacos conocidos como inductores o inhibidores enzimáticos hepáticos o que hubieran tomado medicamentos potencialmente tóxicos dentro de los 30 días previos al inicio del estudio.
- G. Voluntarios que hubiesen recibido cualquier medicamento, excepto ácido acetilsalicílico, durante 14 días o 5 vidas medias (cualquiera que sea más largo) previos al inicio del estudio o quienes estuvieran tomando ácido acetilsalicílico antes del estudio.
- H. Voluntarios que hubiesen sido hospitalizados por cualquier problema durante los cuatro meses previos al inicio del estudio.

- I. Sujetos que hubiesen recibido fármacos en investigación dentro de los 90 días previos al estudio.
- J. Sujetos alérgicos a cualquier antibiótico y/o a los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos.
- K. Sujetos que hubiesen ingerido alcohol o bebidas que contengan xantinas (café, té, cocoa, chocolate, mate, refrescos de cola) o que hubieran ingerido alimentos asados al carbón o jugo de toronja dentro de las 72 horas previas al inicio del periodo de hospitalización, o sujetos que hubiesen fumado tabaco dentro de las 72 horas previas al inicio del estudio.
- L. Sujetos que hubiesen donado o perdido 450 ml o más de sangre dentro de los 60 días previos al inicio del estudio.
- M. Sujetos con antecedentes de abuso de drogas y alcoholismo según los criterios del DSM-IVR.
- N. Voluntarias que resultaron positivas a la prueba cualitativa de embarazo.

1.8.3. PROCEDIMIENTO

Después de un ayuno de 12 horas, se administró a cada voluntario 10 mL de suspensión de cefalexina, lo cual es equivalente a una dosis de 500 mg de cefalexina.

Se colectaron de 8 a 10 mL de sangre venosa con equipo Vacutainer estéril y rotulado a los 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1., 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 horas después de la administración del medicamento por vía oral. Asimismo se llevo un registro de los signos vitales durante cada una de las tomas de muestra. El plasma de cada muestra se separó por centrifugación y se almacenó a -70°C hasta su análisis.

1.9. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Cada día de trabajo (4 en total) se realizó un análisis de muestras de acuerdo a la siguiente secuencia: 5 inyecciones para evaluar la adecuabilidad del sistema, blanco reactivos, blanco plasma, curva de calibración (en un rango de concentraciones de 0.3 a 30 $\mu\text{g/mL}$), muestras de 6 voluntarios y puntos de control de calidad (bajo, medio y alto) intercalados entre cada 6 voluntarios. Los estándares y las muestras del estudio fueron analizadas individualmente, mientras que las muestras de control de calidad se analizaron en réplicas, colocando una muestra control cada 14 inyecciones. El integrador computacional Empower de Waters fue usado para determinar las áreas de Cefalexina.

El área de Cefalexina (y) y la concentración de los estándares (x) fueron ajustados por medio de un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, donde "b" es la ordenada al origen (intercepto-y) y "m" es la pendiente de la curva de calibración. Para cuantificar las muestras del estudio, el área de Cefalexina fue convertida a concentración utilizando estos parámetros estadísticos generados.

1.9.1. CRITERIOS DE VALIDEZ DE LA CORRIDA

La validez de cada corrida durante el procesamiento de las muestras fue determinada examinando los resultados de la linealidad y muestras de control de calidad. Una corrida analítica fue aceptada sí:

- a) Una curva de calibración se consideró aceptable si el 75% o un mínimo de seis valores de concentraciones estándar (incluyendo la concentración superior), caen dentro del $\pm 15\%$ excepto para el límite de cuantificación, el cual debía estar en el $\pm 20\%$ con respecto a su valor nominal y el valor del coeficiente de correlación "r" sea ≥ 0.99 .
- b) Si al menos el 67% de los valores de control de calidad se encontró dentro del límite $\pm 20\%$ de los valores esperados; 33% de las muestras de control de calidad (no más del 50% para cada nivel de concentración) pudo estar fuera del criterio del $\pm 20\%$ con respecto a su valor nominal para que la corrida fuese aceptada. Las concentraciones para las muestras de control de calidad baja, media y alta debieron ser diferentes de las usadas en la curva de calibración para proveer más puntos de verificación.
- c) Si más del 75% del total de muestras analizadas en la corrida presentaron un coleo en los picos cromatográficos de interés menor a 2 (calculado con el integrador Empower Waters con el método USP), repitiendo el análisis de aquellas muestras que no cumplan con dicho criterio.

1. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1.1. OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CEFALEXINA EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La longitud de onda máxima de absorción (λ) de la Cefalexina fue de 260 nm.

La fase móvil elegida consistió de una mezcla de solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico 0.02M pH 7.0 / ACN en proporción de 89:11 v/v a un flujo de 1 mL/min.

En el método de extracción la centrifugación para la precipitación de proteínas con Acetonitrilo se cambió de una velocidad de 3000 rpm durante 10 minutos a una velocidad de 14000 rpm durante 3 minutos con la finalidad de minimizar los tiempos de proceso y obtener una muestra más limpia.

La columna cromatográfica empleada fue la YMC ODS-AQ S-5 120Å de 3.0 x 150mm.

Lo anterior fue elegido, ya que en estas condiciones se obtuvieron los mejores resultados para los parámetros cromatográficos de resolución (R), factor de capacidad (k'), simetría de picos y tiempo de retención.

En la Tabla 3 se presentan las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis de las muestras después de la optimización del método:

Tabla 1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Detector	Arreglo de diodos
Longitud de onda	260 nm
Columna	Waters YMC ODS-AQ S-5 120A, de 3.0 x 150 mm
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfatos 0.02M pH 7.0 / ACN (89:11 v/v)
Velocidad de flujo	1 mL/min.
Volumen de inyección	20 μ L
Temperatura de análisis	Ambiente
Tiempo de corrida	4.5 min.

El método de extracción final se muestra en la figura 2:

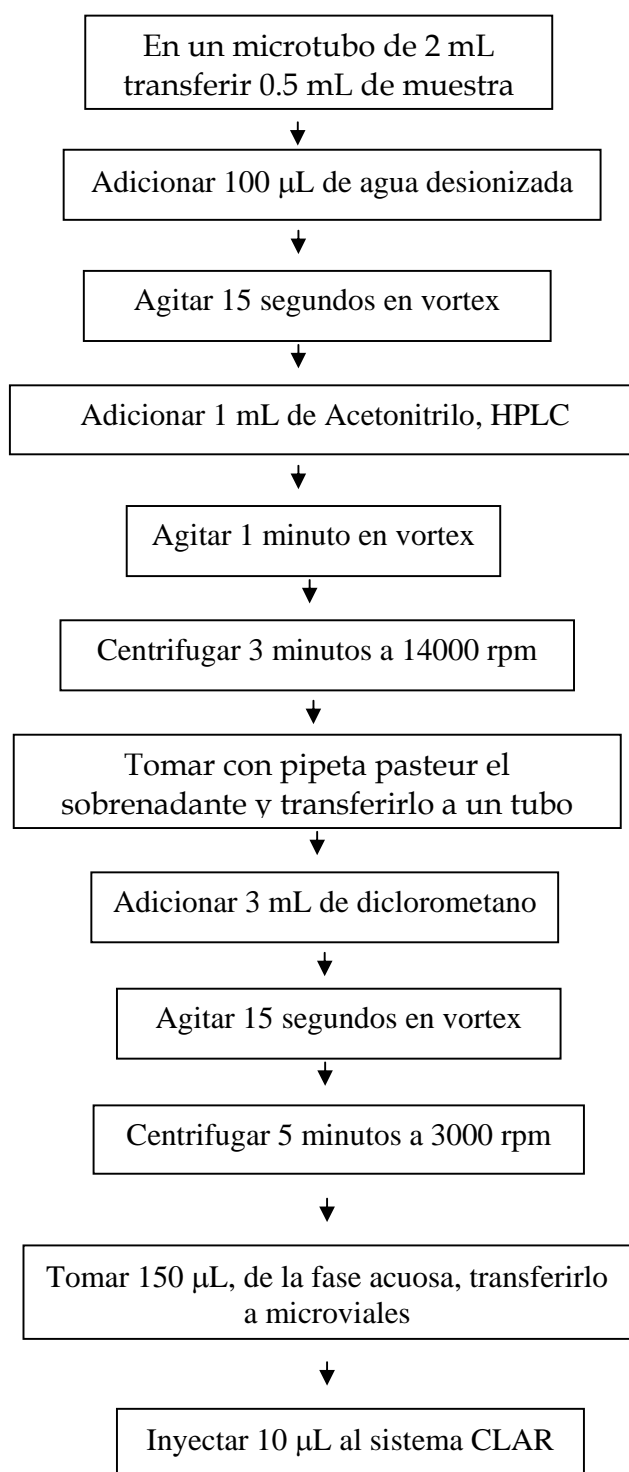


Figura 1. Diagrama del método

1.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFALEXINA EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

1.2.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO

El método fue lineal en el rango de concentraciones de 0.3 a 30 $\mu\text{g/mL}$; todos los valores del coeficiente de correlación (r) obtenidos fueron de 0.9997 o mayores. El valor promedio para la pendiente (m) fue de 0.99994y para la ordenada al origen (b) fue de 0.00044. La tabla 4 muestra las áreas de los picos de Cefalexina obtenidos en la linealidad del método para la cuantificación de cefalexina en plasma, mientras que la figura 3 ilustra la curva patrón promedio correspondiente.

Tabla 2. PRUEBA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR CEFALEXINA EN PLASMA (CONCENTRACION RECUPERADA).

CONCENTRACIÓN CEFALEXINA ($\mu\text{g/mL}$)												
CURVA	0.3	0.6	1.5	1.8	2.4	3	12	18	30	m	b	r
1	0.33	0.63	1.55	1.86	2.54	3.00	11.92	17.39	30.38	1.0000	-0.0001	0.9997
2	0.32	0.64	1.53	1.76	2.31	2.93	12.29	17.81	30.01	0.9999	0.0006	0.9999
3	0.26	0.58	1.51	1.73	2.47	3.04	12.07	17.94	30.00	0.9999	0.0008	1.0000
Prom.	0.303	0.617	15.30	1.530	2.440	2.990	12.093	17.713	30.130	0.9999	0.0004	0.9999
D.E.	0.038	0.032	0.020	0.020	0.118	0.056	0.186	0.287	0.217			
C.V.%	12.48	5.21	1.31	1.31	4.83	1.86	1.54	1.62	0.72			

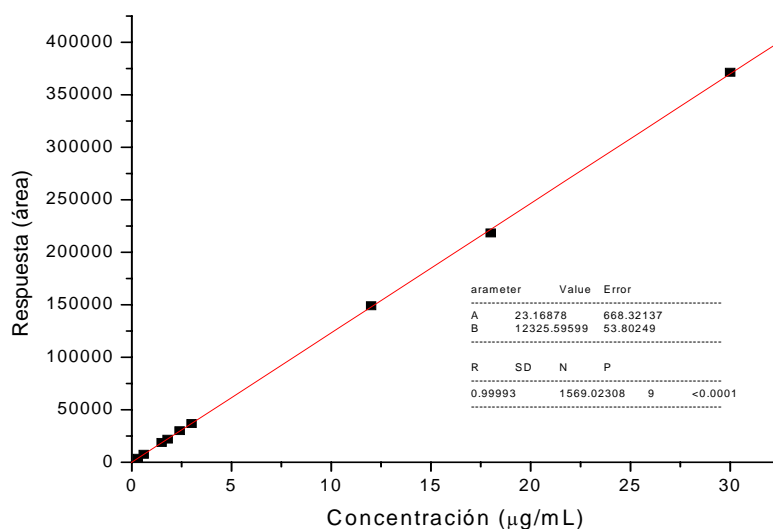


Figura 2. Linealidad del método para cuantificar Cefalexina en plasma.

Para obtener los promedios reportados anteriormente, se partió de pesadas independientes, esto con el fin de comprobar que el método de elección tiene una respuesta proporcional, reproducible y continua en un rango de concentraciones de 0.3 a 30 $\mu\text{g/mL}$, y así asegurar el uso de un modelo matemático que describa la relación entre concentración y respuesta para la cuantificación de este fármaco en plasma.

1.2.2. PRESICIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

○ REPETIBILIDAD.

En la tabla 5 podemos observar los resultados correspondientes a la repetibilidad, en los que el coeficiente de variación (CV) en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor que 2.55%, lo cual, cumple con lo señalado anteriormente en la parte experimental, en donde el criterio para que el método sea repetible, es que el CV debe ser menor al 15%. Mientras que la desviación absoluta (Desv. abs%) en los niveles de concentración estudiados fue menor que 3.03%; por lo que se puede asegurar que la variación de este método dentro del laboratorio y bajo las mismas condiciones nos van a arrojar una respuesta con un alto grado de concordancia entre cada uno de los resultados analíticos individuales.

Tabla 3. REPETIBILIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CEFALEXINA EN PLASMA.

Análisis No.	Cantidad recuperada (µg/mL)		
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
1	1.226	5.909	24.380
2	1.226	6.094	23.410
3	1.224	6.046	23.968
4	1.278	6.170	24.658
5	1.228	6.231	25.006
Promedio	1.236	6.090	24.284
D.E.	0.023	0.123	0.619
C.V.%	1.88	2.03	2.55
Cantidad adicionada (µg/mL)	1.2	6	24
Desv.abs %	3.03	1.50	1.18

○ REPRODUCIBILIDAD.

La reproducibilidad se evaluó variando dos condiciones de análisis diferentes, tales como análisis en diferentes días y análisis llevados a cabo por diferentes analistas.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la reproducibilidad interdía, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 1.27 a 3.08%, mientras que la desviación absoluta % fue menor a 1.85 %, en las diferentes concentraciones evaluadas. En la tabla 7 se observan los resultados de la evaluación de la reproducibilidad entre analistas en los que podemos observar que el C.V.% entre analistas no se encuentra arriba del 2.9% y la desviación absoluta máxima fue del 2.32%.

Tabla 4. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFALEXINA EN PLASMA EN TRES DIAS DIFERENTES.

Día	Réplica	Cantidad recuperada (µg/mL)		
1	1	1.226	5.909	24.380
	2	1.226	6.094	23.410
2	1	1.212	6.041	23.980
	2	1.155	6.073	24.043
3	1	1.253	6.041	24.015
	2	1.261	6.135	23.927
Promedio		1.222	6.049	23.959
D. E.		0.038	0.077	0.313
C.V. %		3.08	1.27	1.31
Cantidad adicionada (µg/mL)		1.2	6	24
Desv. abs. %		1.85	0.81	0.17

Tabla 5. REPRODUCIBILIDAD DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFALEXINA EN PLASMA ENTRE ANALISTAS EN TRES DIAS DIFERENTES.

Día	Réplica	Analista	Cantidad recuperada (µg/mL)		
1	1	1	1.226	5.909	24.380
	2		1.226	6.094	23.410
2	1		1.212	6.041	23.980
	2		1.155	6.073	24.043
3	1		1.253	6.041	24.015
	2		1.261	6.135	23.927
1	1	2	1.214	6.026	23.728
	2		1.181	6.071	24.003
2	1		1.275	6.100	24.258
	2		1.264	6.078	23.835
3	1		1.237	6.168	23.728
	2		1.230	5.951	23.680
Promedio			1.228	6.057	23.916
D. E.			0.035	0.072	0.263
C.V. %			2.83	1.19	1.10
Cantidad adicionada (µg/mL)			1.2	6	24
Desv. abs. %			2.32	0.95	0.35

Ya que los valores en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, no exceden el límite del 15% para el coeficiente de variación y están dentro del $\pm 15\%$ de la concentración nominal, se considera que el método es preciso y exacto.

Adicionalmente se realizó un análisis de varianza, en donde se encontró que no había diferencia significativa entre analistas (Apéndice II).

1.2.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Para Cefalexina el límite de cuantificación (LC) fue de $0.3 \mu\text{g/mL}$. En este nivel, la precisión intradía fue de 8.79% y la exactitud (desviación absoluta %) fue de 4.73.

El método tiene una capacidad de cuantificación lo suficientemente baja como para medir con exactitud y precisión muestras con concentraciones de fármaco hasta de $0.3 \mu\text{g/mL}$. Con lo anterior se puede decir que el equipo podría llegar a presentar un nivel de ruido hasta de $0.03 \mu\text{g/mL}$ sin que afecte los resultados.

1.2.4. LIMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección para cefalexina fue de $0.12 \mu\text{g/mL}$. Con esta concentración se observa una señal por encima del ruido detectado por el equipo.

1.2.5. SELECTIVIDAD

Después de añadir paracetamol ($20 \mu\text{g/mL}$), heparina y ácido acetilsalicílico ($300 \mu\text{g/mL}$) a diferentes muestras plasmáticas y procesarlas de acuerdo a lo descrito anteriormente, no se observó ninguna señal que interfiriera con el pico de interés, por lo cual el método se considero selectivo respecto a estos fármacos para la cuantificación de Cefalexina en plasma. En la figura 4 se muestran los cromatogramas representativos del análisis realizado.

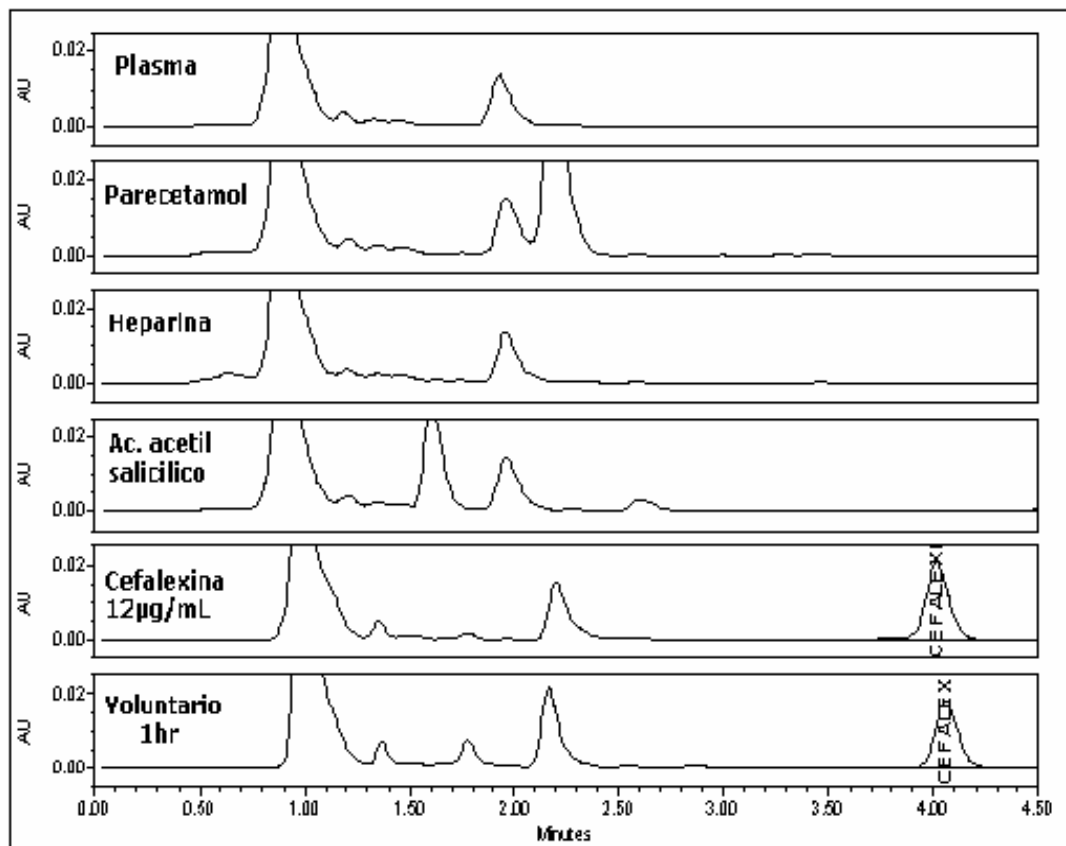


Figura 3. Cromatogramas de selectividad del método para la Cuantificación de Cefalexina en plasma.

1.2.6. RECOBRO

El recobro absoluto promedio fue del 97.56%, determinado a las concentraciones de 1.2 µg/mL (nivel bajo), 6 µg/mL (nivel medio) y 24 µg/mL (alto). Los resultados se presentan en la tabla 8.

Tabla 6. RECOBRO DE CEFALEXINA DE PLASMA HUMANO.

Estándar	Área de Cefalexina Estándar en plasma (extraído)	Área de Cefalexina Estándar en fase móvil (no extraído)	Recobro %
	297204	305106	
Alto	285367	305115	
24.0 µg/mL	292178	303577	
	300587	307180	
	304834	300235	
Promedio	296034	304243	97.30
	71932	77434	
Medio	74189	78215	
6.0 µg/mL	73611	76555	
	75119	76602	
	75870	78008	
Promedio	74144	77363	95.84
	14819	14666	
Bajo	14832	14996	
1.2 µg/mL	15041	15418	
	15457	15543	
	14851	14719	
Promedio	15000	15068	99.55
Recobro absoluto promedio			97.56

Como se puede observar el por ciento de recobro obtenido para cada nivel de concentración fue muy cercano al 100%, por lo cual este método es adecuado para cuantificar Cefalexina en plasma.

1.2.7. ESTABILIDAD

a. Ciclo congelación-descongelación. Los resultados del análisis presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor original (tiempo 0), por lo que se considera que Cefalexina es estable bajo dos ciclos de congelación y descongelación (ver tabla 9).

b. Temperatura ambiente. Los resultados del análisis de las muestras de plasma almacenadas a temperatura ambiente durante 24 y 48 horas, presentaron una desviación absoluta mayor al 15%, por lo que se considera que Cefalexina es inestable a temperatura ambiente desde las 24 horas (ver tabla 10).

c. Refrigeración. Los resultados del análisis de las muestras de plasma almacenadas en refrigeración durante 24 y 48 horas, presentaron una desviación absoluta mayor al 15% con respecto al valor original, por lo que se considera que Cefalexina no es estable bajo estas condiciones (ver tabla 11).

d. Congelación. Los resultados del análisis de las muestras almacenadas en a -70°C presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor original, por lo que se considera que Cefalexina es estable en congelación durante este tiempo (ver tabla 12).

e. Estabilidad de la muestra procesada. Los resultados del análisis de las muestras procesadas a temperatura ambiente se presentan en la tabla 13, en la cual se puede observar que el Cefalexina fue estable en la solución de inyección durante 96 horas después de su preparación ya que su desviación absoluta no fue mayor del 15% con respecto al valor original.

Tabla 7. ESTABILIDAD DE CEFALEXINA EN CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

	Inicial		
	Bajo 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Medio 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Alto 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	1.306	5.882	24.484
	1.226	5.964	24.818
Promedio	1.266	5.923	24.651
	1er. Ciclo		
	Bajo 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Medio 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Alto 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	1.165	5.470	23.049
	1.189	5.603	23.270
Promedio	1.177	5.537	23.160
Desv.abs%	7.030	6.525	6.050
	2º. Ciclo		
	Bajo 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Medio 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Alto 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	1.217	5.627	23.221
	1.164	5.706	23.239
Promedio	1.191	5.667	23.230
Desv.abs%	5.964	4.331	5.764

Tabla 8. ESTABILIDAD DE CEFALEXINA A TEMPERATURA AMBIENTE.

Inicial			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.306	5.882	24.484
	1.226	5.964	24.818
Promedio	1.266	5.923	24.651
Tiempo 24 horas			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.084	5.088	18.148
	1.042	5.117	18.320
Promedio	1.063	5.103	18.234
Desv.abs%	16.035	13.853	26.031
Tiempo 96 horas			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	0.911	4.342	13.407
	0.805	4.272	13.303
Promedio	0.858	4.307	13.355
Desv.abs%	32.227	27.283	45.824

Tabla 9. ESTABILIDAD DE CEFALEXINA EN REFRIGERACIÓN

Inicial			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.306	5.882	24.484
	1.226	5.964	24.818
Promedio	1.266	5.923	24.651
Tiempo 24 horas			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	0.959	5.338	20.353
	0.912	5.297	20.597
Promedio	0.936	5.318	20.475
Desv.abs%	26.106	10.223	16.940
Tiempo 48 horas			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.016	5.216	18.663
	1.032	5.294	18.319
Promedio	1.024	5.255	18.491
Desv.abs%	19.115	11.278	24.989

Tabla 10. ESTABILIDAD DE CEFALEXINA EN CONGELACIÓN.

Inicial			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.159	6.129	23.510
	1.180	5.881	24.571
Promedio	1.170	6.005	24.041
Tiempo 20 días			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.233	6.372	25.366
	1.271	6.213	25.086
Promedio	1.252	6.293	25.226
Desv.abs%	7.054	4.788	4.931
Tiempo 35 días			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.262	6.360	25.633
	1.258	6.286	25.142
Promedio	1.260	6.323	25.388
Desv.abs%	7.738	5.296	5.603

Tabla 11. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA DE CEFALEXINA

Inicial			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.226	5.909	24.380
	1.226	6.094	23.410
Promedio	1.226	6.002	23.895
Tiempo 24 horas			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.302	6.233	25.070
	1.337	6.421	23.746
Promedio	1.320	6.327	24.408
Desv.abs%	7.626	5.424	2.147
Tiempo 96 horas			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.072	5.076	21.556
	1.165	5.389	19.560
Promedio	1.119	5.233	20.558
Desv.abs%	8.768	12.813	13.965

1.2.8. TOLERANCIA

Los resultados obtenidos después de realizar cambios en la fase móvil se muestran en la tabla 14. El método se consideró tolerante a éstos cambios ya que no se presentó una desviación absoluta con respecto a los valores iniciales, mayor al 15%, por lo que se permitiría en un momento determinado hacer variaciones en la proporción de fase sin comprometer los resultados.

Tabla 12. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA

Condiciones originales: Solución amortiguadora de fosfatos:ACN (89:11 v/v)			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.194	5.834	22.157
	1.158	5.903	24.229
Promedio	1.176	5.869	23.193
Cambio en la proporción de fase móvil a (90:10 v/v).			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.184	6.030	222.562
	1.218	6.017	24.284
Promedio	1.201	6.024	23.423
Desv. abs%	2.126	2.641	0.992
Cambio en la proporción de fase móvil a (91:9 v/v).			
	Bajo 1.2 µg/mL	Medio 6.0 µg/mL	Alto 24.0 µg/mL
	1.200	6.063	22.407
	1.175	6.127	24.346
Promedio	1.188	6.095	23.377
Desv. abs%	0.978	3.860	0.791

1.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Las muestras del estudio fueron analizadas en cuatro corridas diferentes. Los resultados de las muestras de control de calidad de todas las corridas del estudio están resumidos en la tabla 15, mientras que los resultados de las curvas de calibración de todas las corridas del estudio están resumidos en la tabla 16.

Los valores de "r" mostrados a lo largo del estudio fueron de 0.9998 o mayores; mientras que la reproducibilidad de los estándares fue del 4.87% o mejor. La exactitud fue del 4.33% o mejor para todos los puntos.

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

Las concentraciones plasmáticas de Cefalexina por voluntario se encuentran en el apéndice III.

Tabla 13. SEGUIMIENTO DE LAS MUESTRAS DE CONTROL DE CALIDAD PARA CEFALEXINA.

Día	Voluntarios	CEFALEXINA en plasma ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		Control bajo 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Control medio 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Control alto 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	1.2.3.4.5.6	1.251	5.860	23.890
		1.121	5.919	24.255
2	7.8.9.10.11.12	1.121	5.745	22.836
		1.145	5.922	22.021
3	13.14.15.16.17.18	1.162	5.952	24.415
		1.210	5.642	24.281
4	19.20.21.22.23.24	1.108	5.861	23.444
		1.194	5.936	23.777
Promedio		1.164	5.854	23.614
D.E.(n-1)		0.050	0.108	0.825
C.V.%		4.330	1.849	3.496
Conc. nominal		1.2	6	24
Desv.abs(%)		3.000	2.433	1.608

Tabla 14. SEGUIMIENTO DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA CEFALEXINA.

Día	Voluntarios	Cefalexina en Plasma ($\mu\text{g/mL}$)	Intercepto (b)	Pendiente (m)	Coefficiente de correlación (r)
1	1.2.3.4.5.6	0.31 0.61 1.52 1.85 2.52 3.05 11.76 17.74 30.23	-0.00097	0.99998	0.99988
2	7.8.9.10.11.12	0.31 0.54 1.48 1.85 2.44 3.04 11.89 18.06 30.00	0.00179	0.99991	0.99999
3	13.14.15.16.17.18	0.32 0.64 1.51 1.82 2.48 3.07 11.76 17.81 30.20	0.00015	1.00012	0.99991
4	19.20.21.22.23.24	0.31 0.59 1.50 1.79 2.40 2.96 11.97 18.15 29.93	-0.00090	1.00012	0.99998
Promedio		0.31 0.60 1.50 1.83 2.46 3.03 11.84 17.94 30.09	0.00002	1.00003	0.99994
D.E.(n-1)		0.01 0.04 0.02 0.03 0.05 0.05 0.10 0.20 0.15			
C.V.%		1.6 7.06 1.14 1.57 2.10 1.59 0.87 1.09 0.49			
Conc. nominal		0.3 0.6 1.5 1.8 2.4 3 12 18 30			
Desv. abs. %		3.33 0.00 0.00 0.02 2.50 0.01 0.01 0.33 0.30			

En la tabla 17 y Figura 5 se muestran las concentraciones plasmáticas promedio de Cefalexina, obtenidas a los diferentes tiempos de muestreo, en voluntarios sanos a los que se les administró una dosis única de Cefalexina por vía oral (suspensión). Los datos individuales se muestran en el apéndice IV.

Tabla 15. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS PROMEDIO PARA 24 VOLUNTARIOS

Tiempo (horas)	Cefalexina en Plasma (µg/mL)	D. E. (n-1) (±)
0	0.000	0.00
0.25	8.693	7.87
0.5	20.188	8.02
0.75	20.307	4.97
1	16.445	3.35
1.25	12.753	3.08
1.5	9.897	2.80
1.75	8.055	2.35
2	6.632	2.05
3	3.321	1.57
4	1.548	0.74
5	0.801	0.34
6	0.526	0.16
7	0.469 (n=4)	0.09

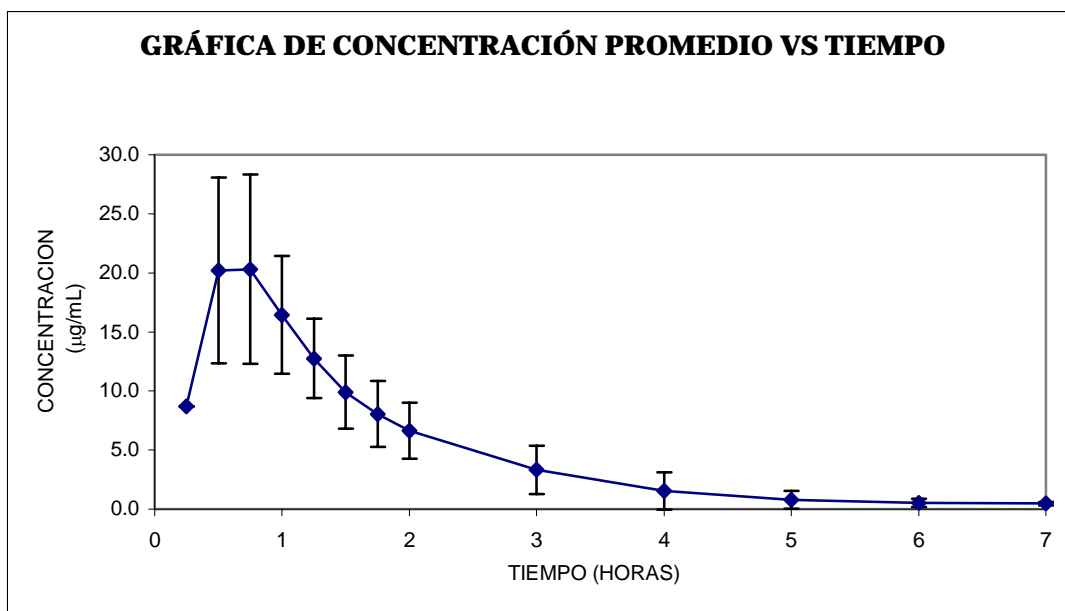


Figura 4. Grafica de valores promedio de Cefalexina en plasma después de una administración única de una dosis oral de 500mg

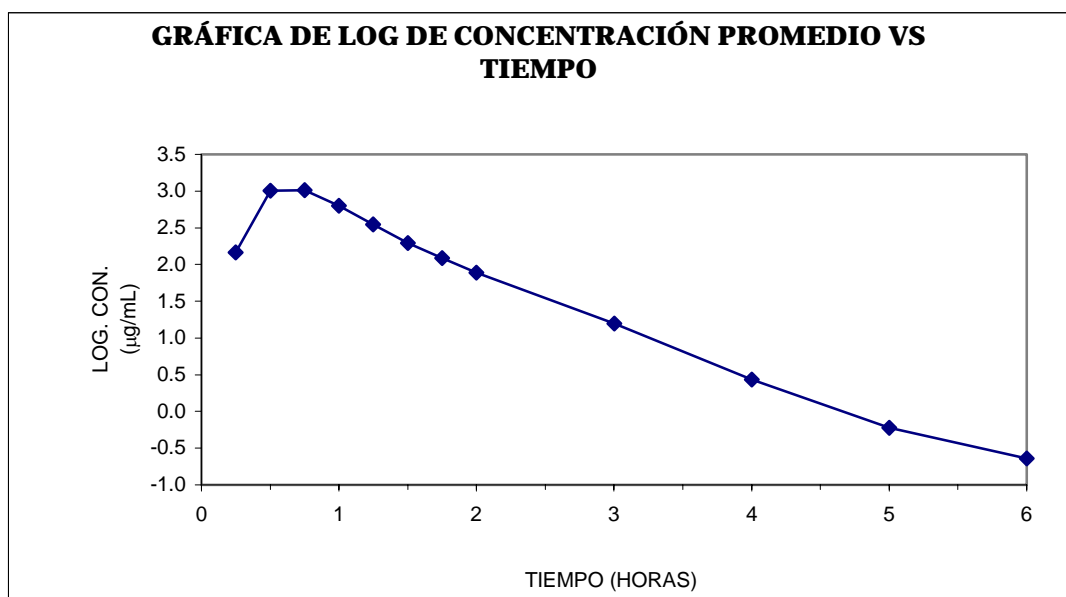


Figura 5. Grafica de logaritmo de los valores promedio de Cefalexina en plasma después de una administración única de una dosis oral de 500mg.

Los parámetros farmacocinéticos reportados fueron obtenidos de la siguiente manera:

- La concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) se obtiene al graficar la concentración plasmática vs tiempo; una vez identificado el punto más alto de la gráfica se extrapola una línea hasta el eje de las ordenadas, el valor en este eje corresponde al $C_{m\acute{a}x}$; mientras que si se extrapola una línea al eje horizontal, el valor obtenido corresponde a el tiempo de máxima absorción (T_{max}).
- La constante de eliminación (K_e) es la pendiente de la gráfica del logaritmo de la concentración vs tiempo.
- La constante de absorción (K_a) es la pendiente que se obtiene al utilizar el método de las residuales.
- El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_e}$$

- El área bajo la curva de la concentración del fármaco al tiempo t (ABC_{0-t}), se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$ABC_{0-t} = \sum \frac{(C_{p_n} + C_{p_{n+1}})}{2} * \Delta t$$

- El área bajo la curva de concentración de fármaco a tiempo infinito ($ABC_{0-\infty}$), se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$ABC_{0-\infty} = \sum \frac{(Cp_n + Cp_{n+1}) * \Delta t}{2} + \frac{Cp_{\text{último}}}{ke}$$

En la tabla 18 se muestran los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos después de administrar una dosis única de suspensión de Cefalexina 500mg administrada por vía oral.

Tabla 16. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PROMEDIO PARA CEFALEXINA OBTENIDOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL EN VOLUNTARIOS SANOS.

PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	34.85 $\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$
$ABC_{0-\infty}$	35.44 $\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$
ke	0.835 h^{-1}
$T_{1/2}$	0.861 h
C_{max}	20.307 $\mu\text{g} / \text{mL}$
T_{max}	0.75 h
ka	4.462 h^{-1}

Welling. et. al. obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos en voluntarios de sexo masculinos en población caucásica, después de administrar una dosis única de 500 mg por vía oral: C_{max} de 17.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, T_{max} de 1 hr, $t_{1/2}$ de 0.7 hrs.⁽¹⁴⁾

De igual manera existen reportes en donde después de una dosis única 500 mg se obtuvo un $t_{1/2}$ de 0.9 horas, una C_{max} de 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y una ke de 0.770 h^{-1} .⁽²⁾

Al comparar los resultados anteriores con los obtenidos en nuestro estudio podemos concluir que no se observan diferencias en la biodisponibilidad en la población mexicana y la reportada en población caucásica.

Al hacer un análisis estadístico de la influencia del género en la biodisponibilidad de Cefalexina cuantificada en plasma, analizando 3 diferentes parámetros como $C_{\text{máx}}$, ABC_{0-t} y de $ABC_{0-\infty}$, no se encontró diferencia significativa en los resultados (Apéndice V).

1. CONCLUSIONES

Respecto a la validación del método analítico optimizado para la cuantificación de Cefalexina en plasma se puede concluir lo siguiente:

- Es lineal en el rango de concentraciones de 0.3 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Es reproducible en diferentes días y siendo llevado a cabo por diferentes analistas.
- El límite de cuantificación es de 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- El límite de detección es de 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Es selectivo para ácido Acetilsalicílico, paracetamol y heparina.
- El recobro absoluto promedio es del 97.56%.
- Es estable en congelación a -70°C , en ciclos de congelación-descongelación y en la muestra procesada durante 96 h después de su preparación. Es inestable a temperatura ambiente y en refrigeración.
- Es tolerante a variaciones en la proporción de fase móvil, de 89:11 v/v a 91.9 v/v de solución amortiguadora de fosfatos:ACN.

Por lo anterior el método analítico optimizado para la cuantificación de Cefalexina en plasma cumple con el propósito para el cual fue diseñado.

La metodología analítica validada se aplicó exitosamente a un grupo de muestras recolectadas de voluntarios mexicanos sanos a los cuales se les administró una dosis única de 500 mg de Cefalexina en suspensión por vía oral.

No se observan diferencias en la biodisponibilidad entre la población mexicana y la reportada en población caucásica.

No se observaron diferencias significativas al evaluar la diferencia de género en la biodisponibilidad de Cefalexina en plasma.

APÉNDICE I

DECLARACIÓN DE HELSINKI

Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial

Recomendaciones para guiar a los doctores en medicina en la investigación biomédica en sujetos humanos

Adoptada por la XVIII Asamblea Médica Mundial, en Helsinki, Finlandia, en junio de 1964 y modificada por la XXIX Asamblea Médica Mundial en Tokio, Japón, en octubre de 1975, la XXXV Asamblea Médica Mundial en Venecia, Italia, en octubre de 1983, la XLI Asamblea Médica Mundial en Hong Kong, en septiembre de 1989 y por la XLVIII Asamblea General en Somerset West, República de Sudáfrica, en octubre de 1996.

INTRODUCCION.

La misión del doctor en medicina es salvaguardar la salud de las personas. Sus conocimientos y su conciencia están dedicados al cumplimiento de esta misión.

La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial obliga al médico con las palabras: "Mi primera consideración será la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica declara que: "El médico actuará exclusivamente en interés del paciente cuando proporcione atención médica que pueda tener el efecto de debilitar el estado físico y mental del paciente".

El propósito de la investigación biomédica en sujetos humanos debe ser mejorar los procedimientos diagnósticos, terapéuticos y profilácticos y la comprensión de la etiología y la patogenesis de la enfermedad.

En la práctica actual de la medicina, casi todos los procedimientos diagnósticos, terapéuticos o profilácticos entrañan riesgos. Esto es especialmente aplicable a la investigación biomédica.

El progreso de la medicina está basado en la investigación que, esencialmente, debe depender en parte de la experimentación en sujetos humanos.

En el campo de la investigación biomédica, se debe reconocer una distinción fundamental entre la investigación médica en donde el objetivo es esencialmente diagnóstico o terapéutico para un paciente, y la investigación médica cuyo objeto esencial es puramente científico y no implica utilidad diagnóstica o terapéutica directa para la persona sometida a la investigación.

Se debe proceder con especial precaución en la ejecución de la investigación que pueda afectar el medio ambiente y el bienestar de los animales utilizados para la investigación debe ser respetado.

Puesto que es indispensable que los resultados de los experimentos en laboratorio sean aplicados a seres humanos para ampliar el conocimiento científico y para ayudar a la humanidad doliente, la Asociación Médica Mundial ha elaborado las siguientes recomendaciones como una guía para todos los doctores que participen en la investigación biomédica en sujetos humanos. Estas recomendaciones deben ser mantenidas bajo revisión en el futuro. Se debe subrayar que, como están redactadas, las normas sólo constituyen una guía para los médicos de todo el mundo. Los médicos no son relevados de las responsabilidades penales, civiles y éticas bajo las leyes de sus propios países.

I. PRINCIPIOS BASICOS.

1. La investigación biomédica en la que participen sujetos humanos debe ajustarse a los principios científicos generalmente aceptados y debe estar basada en la experimentación de laboratorio y en animales, realizada en forma adecuada y en un conocimiento completo de la literatura científica.

2. El diseño y la ejecución de cada procedimiento experimental en donde participen sujetos humanos deben estar formulado claramente en un protocolo experimental el cual debe ser comunicado para su consideración, comentario y orientación a una comisión designada especialmente, independiente del investigador y el patrocinador, con la condición que esta comisión independiente esté en conformidad con las leyes y reglamentos del país en donde se lleve a cabo el experimento de investigación.

3. La investigación biomédica en sujetos humanos solo debe ser llevada a cabo por personas calificadas científicamente y bajo la supervisión de una persona médica clínicamente competente. La responsabilidad respecto al sujeto humano siempre debe recaer en la persona calificada médicamente y nunca debe depender del sujeto de la investigación, aunque éste haya otorgado su consentimiento.

4. La investigación biomédica realizada en sujetos humanos no puede llevarse a cabo en forma legítima a menos que la importancia del objetivo sea proporcional al riesgo inherente para el sujeto.

5. Todo proyecto de investigación biomédica con sujetos humanos debe ser precedido por una evaluación cuidadosa de los riesgos predecibles en comparación con los beneficios previsibles para el sujeto o para otras personas. La preocupación por los intereses del sujeto siempre debe prevalecer sobre los intereses de la ciencia y la sociedad.

6. El derecho del sujeto de la investigación a salvaguardar su integridad siempre debe ser respetado. Se deben tomar todas las precauciones necesarias para respetar la privacidad del sujeto y para minimizar el efecto del estudio sobre la integridad física y mental del sujeto y sobre la personalidad del mismo.

7. Los médicos deben abstenerse de entregarse a proyectos de investigación en sujetos humanos, a menos que estén convencidos de que los riesgos implicados están considerados como predecibles. Los médicos deben interrumpir cualquier investigación si se encuentra que los riesgos superan en importancia a los beneficios potenciales.

8. En la publicación de los resultados de su investigación, el médico está obligado a conservar la exactitud de los resultados. Los reportes de la experimentación que no estén de acuerdo con los principios formulados en esta Declaración no deben ser aceptados para publicación.

9. En la investigación realizada en seres humanos, cada sujeto potencial debe ser informado adecuadamente de los objetivos, los métodos, los beneficios previstos y los riesgos potenciales del estudio y de las molestias que éste puede entrañar. El sujeto potencial debe ser informado que está en libertad de abstenerse de participar en el estudio y que está libre para retirar su consentimiento informado otorgado libremente por el sujeto, de preferencia por escrito.

10. Al obtener el consentimiento informado para el proyecto de investigación, el médico debe ser especialmente cauto si el sujeto se encuentra en una relación de dependencia respecto a él o si el sujeto pudiera consentir bajo coacción. En ese caso, el consentimiento informado debe ser obtenido por un médico que no esté participando en esa investigación y que sea totalmente independiente de esta relación oficial.

11. En caso de incompetencia legal, el consentimiento informado se debe obtener del tutor legal, de acuerdo con la legislación nacional. Donde la incapacidad física o mental imposibilite la obtención del conocimiento informado, o cuando el sujeto sea menor de edad, el permiso del pariente responsable

substituye al del sujeto de acuerdo con la legislación nacional. Siempre que el menor de edad realmente pueda otorgar su consentimiento, además del consentimiento de su tutor, se debe obtener el consentimiento del menor.

12. El protocolo de la investigación siempre debe contener un planteamiento de las consideraciones éticas asociadas y debe indicar que se observan los principios enunciados en la presente Declaración.

II. Investigación Médica Combinada con Atención Profesional (Investigación Clínica).

1. En el tratamiento de la persona enferma, el médico debe estar en libertad de utilizar una nueva medida diagnóstica y terapéutica si, en su opinión, ésta ofrece esperanza de salvar la vida, restablecer la salud o aliviar el sufrimiento.

2. Los beneficios, riesgos y molestias potenciales de un nuevo método deben ser sopesados contra las ventajas de los mejores métodos diagnósticos y terapéuticos existentes.

3. En cualquier estudio médico, a todos los pacientes incluso aquéllos que forman parte de un grupo de control, en caso que lo hubiese- se les deben asegurar los mejores métodos diagnósticos y terapéuticos comprobados. Esto no excluye el uso de un placebo inerte en los estudios donde no exista un método diagnóstico o terapéutico comprobado.

4. La negación del paciente a participar en un estudio nunca debe interferir con la relación médico - paciente.

5. Si el médico considera esencial no obtener el consentimiento informado, las razones específicas de esta propuesta deben ser consignadas en el protocolo experimental para sometimiento a la comisión independiente (ver inciso I. 2).

6. Cuando el objetivo sea la adquisición de nuevos conocimientos médicos, el médico sólo podrá combinar la investigación médica con la atención profesional en la medida que la investigación médica esté justificada por su utilidad diagnóstica o terapéutica potencial para el paciente.

III. Investigación Biomédica No Terapéutica que incluya Sujetos Humanos (Investigación Biomédica No Clínica).

1. En la aplicación puramente científica de la investigación médica llevada a cabo en un ser humano, es obligación del médico seguir siendo el protector de la vida y la salud de la persona en quien se lleve a cabo la investigación biomédica.

2. Los sujetos deben ser voluntarios, ya sean personas sanas o pacientes para quienes el diseño experimental no esté relacionado con la enfermedad de los mismos.

3. El investigador o el equipo de investigación deben discontinuar la investigación si, en su opinión, continuarla pudiera resultar perjudicial para el individuo.

4. En la investigación realizada en el hombre, los intereses de la ciencia y la sociedad nunca deben tener prioridad sobre las consideraciones relacionadas con el bienestar del sujeto.

APENDICE II

**RESULTADOS DEL ANALISIS COMPARATIVO PARA DETERMINAR
POSIBLES DIFERENCIAS ENTRE ANALISTAS**

CONTROL BAJO

One Way Analysis of Variance Thursday, October 20, 2005, 19:46:07

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P = 0.101)

Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Thursday, October 20, 2005, 19:46:07

Data source: Data 1 in Notebook

Group	N	Missing	Median	25%	75%
A1D1	2	0	1.226	1.226	1.226
A1D2	2	0	1.184	1.155	1.212
A1D3	2	0	1.257	1.253	1.261
A2D1	2	0	1.198	1.181	1.214
A2D2	2	0	1.269	1.264	1.275
A2D3	2	0	1.234	1.230	1.237

H = 10.575 with 5 degrees of freedom. (P = 0.060)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.060)

CONTROL MEDIO

One Way Analysis of Variance Thursday, October 20, 2005, 19:47:27

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Thursday, October 20, 2005, 19:47:27

Data source: Data 1 in Notebook

Group	N	Missing	Median	25%	75%
A1D1	2	0	6.002	5.909	6.094
A1D2	2	0	6.057	6.041	6.073
A1D3	2	0	6.088	6.041	6.135
A2D1	2	0	6.048	6.026	6.071
A2D2	2	0	6.089	6.078	6.100
A2D3	2	0	6.059	5.951	6.168

H = 2.296 with 5 degrees of freedom. (P = 0.807)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.807)

CONTROL ALTO

One Way Analysis of Variance Thursday, October 20, 2005, 19:47:45

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Thursday, October 20, 2005, 19:47:45

Data source: Data 1 in Notebook

Group	N	Missing	Median	25%	75%
A1D1	2	0	23.895	23.410	24.380
A1D2	2	0	24.011	23.980	24.043
A1D3	2	0	23.971	23.927	24.015
A2D1	2	0	23.866	23.728	24.003
A2D2	2	0	24.047	23.835	24.258
A2D3	2	0	23.704	23.680	23.728

$H = 3.377$ with 5 degrees of freedom. ($P = 0.642$)

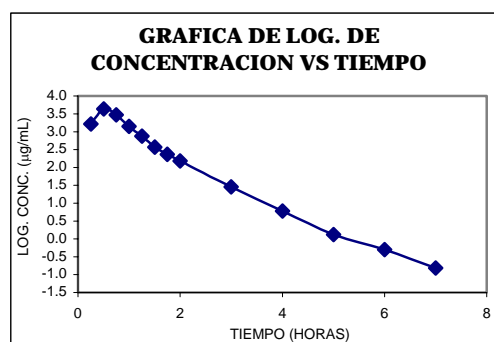
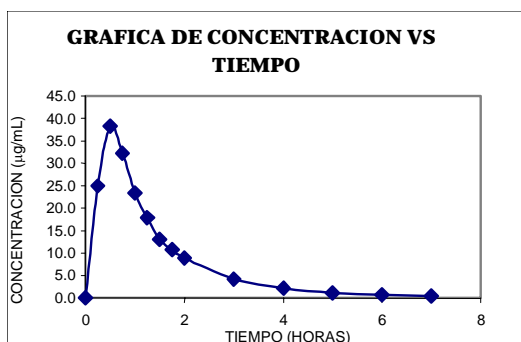
The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.642$)

APENDICE III PARAMETROS FARMACOCINETICOS

VOLUNTARIO 1

Voluntario 1	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	24.931
0.5	38.223
0.75	32.229
1	23.362
1.25	17.805
1.5	13.038
1.75	10.705
2	8.921
3	4.273
4	2.183
5	1.126
6	0.743
7	0.444

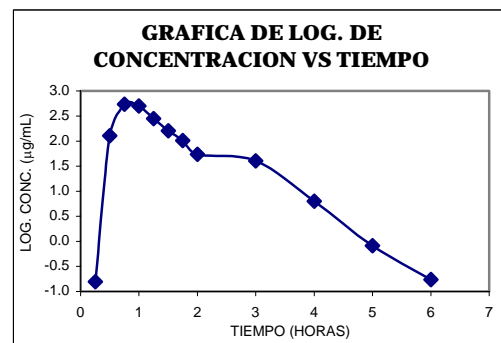
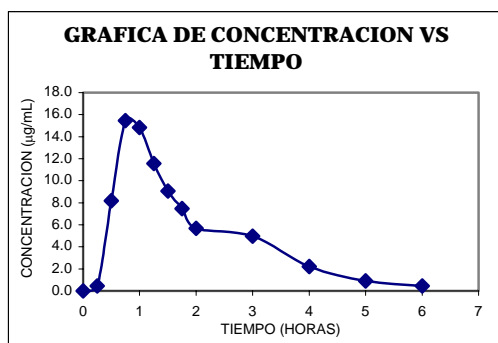
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	54.2 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	54.85 µg*h/mL
k_e	0.683 h ⁻¹
$t_{1/2}$	1.015 h
$C_{m\acute{a}x}$	38.22 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.5 h
k_a	-----



VOLUNTARIO 2

Voluntario 2	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	16.559
0.5	22.939
0.75	19.180
1	14.448
1.25	10.390
1.5	8.399
1.75	6.023
2	4.950
3	2.385
4	1.342
5	0.641
6	0.305
7	NC

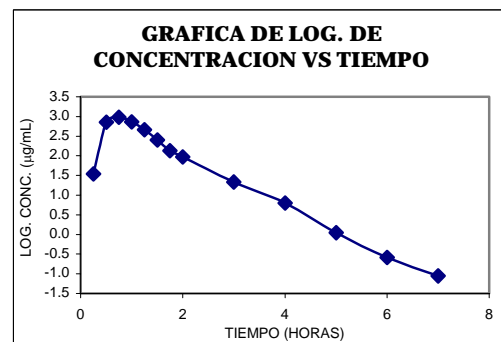
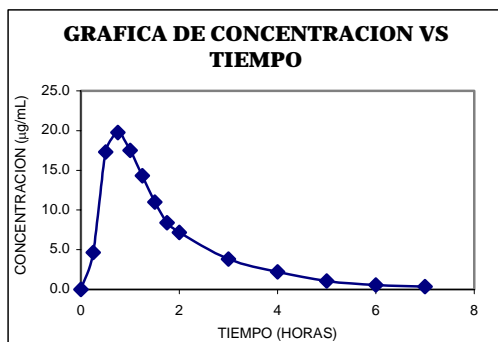
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	32.1 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	32.54 µg*h/mL
k_e	1.059 h ⁻¹
$t_{1/2}$	0.654 h
$C_{m\acute{a}x}$	22.94 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.5 h
k_a	2.881 h ⁻¹



VOLUNTARIO 3

Voluntario 3	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	4.656
0.5	17.329
0.75	19.767
1	17.517
1.25	14.330
1.5	11.008
1.75	8.413
2	7.177
3	3.808
4	2.225
5	1.045
6	0.558
7	0.348

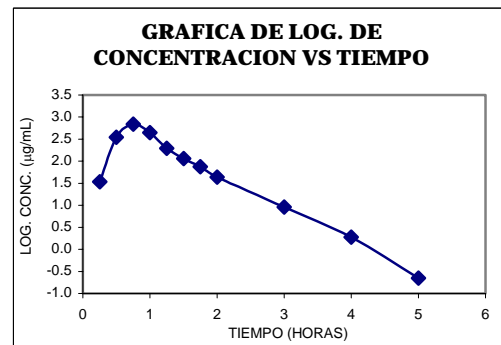
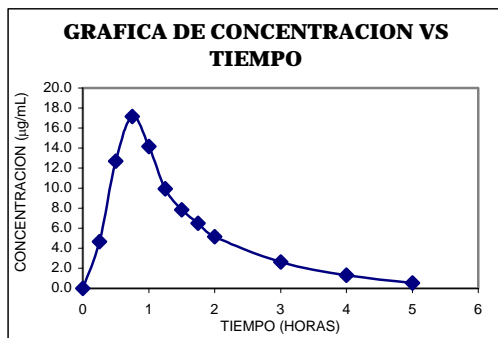
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	35.55 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	36.09 µg*h/mL
k_e	0.644 h ⁻¹
$t_{1/2}$	1.075 h
$C_{m\acute{a}x}$	19.77 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.75 h
k_a	6.409 h ⁻¹



VOLUNTARIO 4

Voluntario 4	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	4.646
0.5	12.684
0.75	17.165
1	14.169
1.25	9.938
1.5	7.833
1.75	6.498
2	5.167
3	2.617
4	1.319
5	0.520
6	NC
7	ND

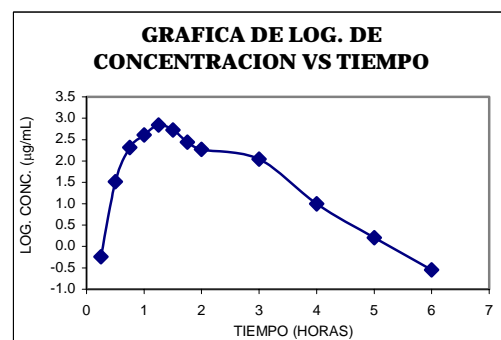
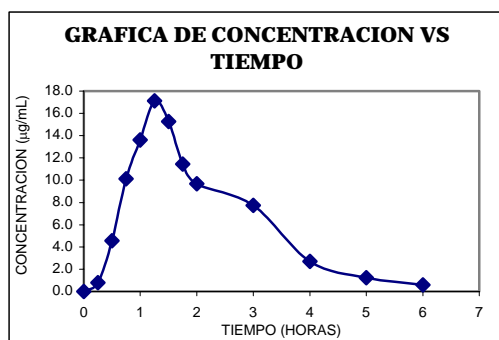
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	25.66 µg*h/mL
ABC _{0-∞}	26.33 µg*h/mL
ke	0.776 h ⁻¹
t _{1/2}	0.893 h
C _{máx}	17.17 µg/mL
T _{máx}	0.75 h
ka	2.315 h ⁻¹



VOLUNTARIO 5

Voluntario 5	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	0.788
0.5	4.544
0.75	10.135
1	13.605
1.25	17.127
1.5	15.260
1.75	11.441
2	9.677
3	7.738
4	2.713
5	1.228
6	0.579
7	NC

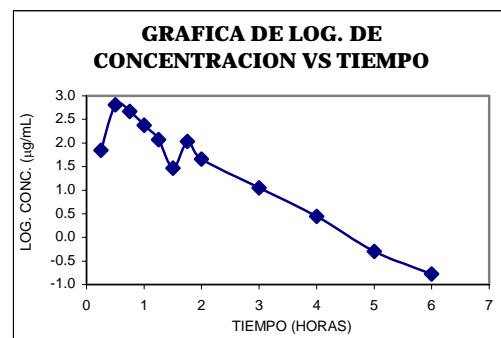
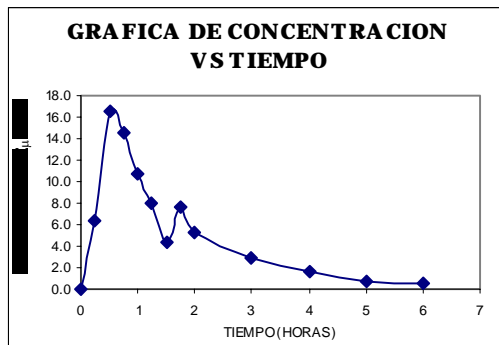
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	36.24 µg*h/mL
ABC _{0-∞}	36.92 µg*h/mL
ke	0.851 h ⁻¹
t _{1/2}	0.814 h
C _{máx}	17.13 µg/mL
T _{máx}	1.75 h
ka	0.511 h ⁻¹



VOLUNTARIO 6

Voluntario 6	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	6.330
0.5	16.571
0.75	14.461
1	10.779
1.25	7.940
1.5	4.343
1.75	7.604
2	5.271
3	2.851
4	1.564
5	0.741
6	0.462
7	NC

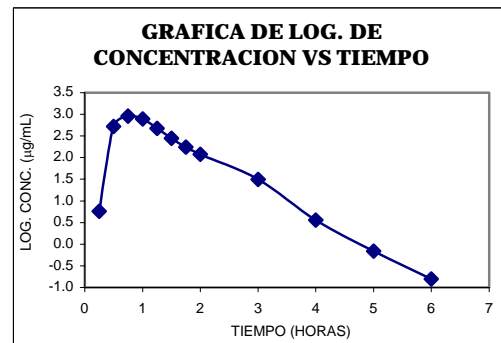
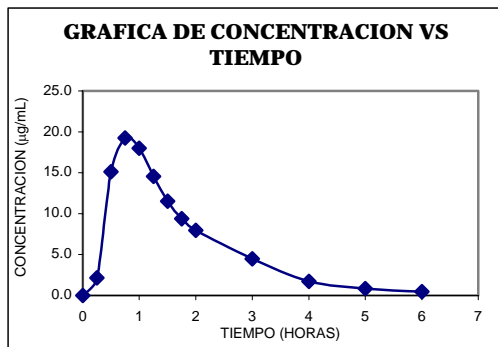
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	25.69 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	26.43 µg*h/mL
k_e	0.624 h ⁻¹
$t_{1/2}$	1.110 h
$C_{m\acute{a}x}$	16.57 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.5 h
k_a	-----



VOLUNTARIO 7

Voluntario 7	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	10.299
0.5	25.299
0.75	23.466
1	17.905
1.25	13.736
1.5	10.717
1.75	8.266
2	6.818
3	3.628
4	1.393
5	0.624
6	NC
7	NC

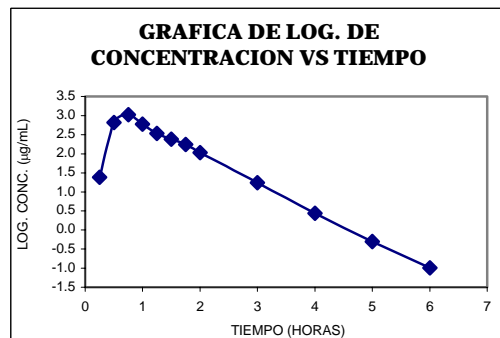
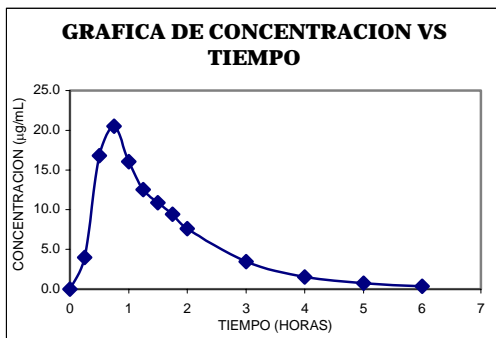
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	37.02 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	37.78 µg*h/mL
k_e	0.587 h ⁻¹
$t_{1/2}$	1.181 h
$C_{m\acute{a}x}$	25.3 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.5 h
k_a	4.268 h ⁻¹



VOLUNTARIO 8

Voluntario 8	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	3.984
0.5	16.813
0.75	20.494
1	16.033
1.25	12.543
1.5	10.870
1.75	9.412
2	7.624
3	3.467
4	1.552
5	0.737
6	0.370
7	NC

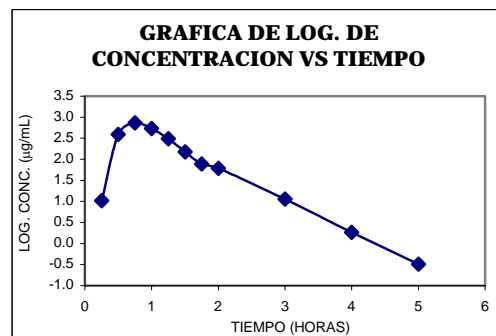
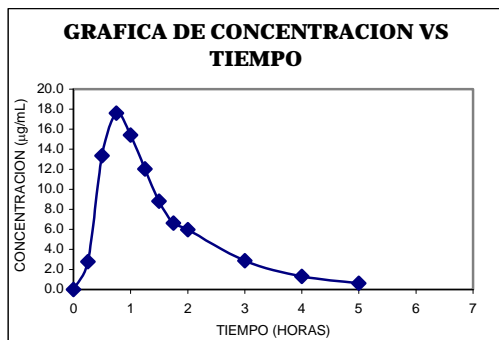
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	33.24 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	33.73 µg*h/mL
k_e	0.755 h ⁻¹
$t_{1/2}$	0.918 h
$C_{m\acute{a}x}$	20.49 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.75 h
k_a	5.150 h ⁻¹



VOLUNTARIO 9

Voluntario 9	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	16.556
0.5	21.616
0.75	20.495
1	15.372
1.25	11.849
1.5	9.083
1.75	6.342
2	5.107
3	2.415
4	1.116
5	0.549
6	NC
7	NC

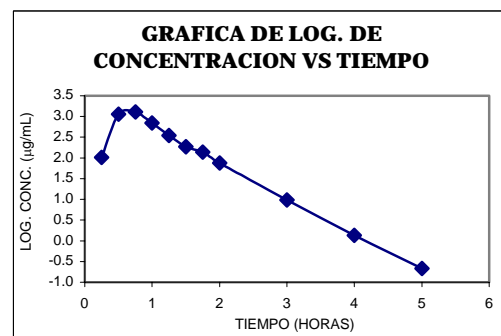
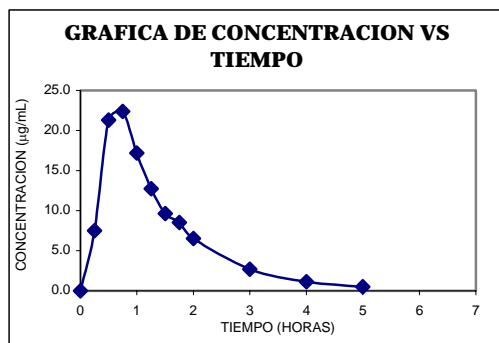
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	32.33 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	33.06 µg*h/mL
k_e	0.837 h ⁻¹
$t_{1/2}$	0.828 h
$C_{m\acute{a}x}$	21.62 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.5 h
k_a	4.510 h ⁻¹



VOLUNTARIO 10

Voluntario 10	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	11.770
0.5	25.046
0.75	22.756
1	17.579
1.25	12.774
1.5	9.841
1.75	8.625
2	6.252
3	2.818
4	1.188
5	0.485
6	NC
7	ND

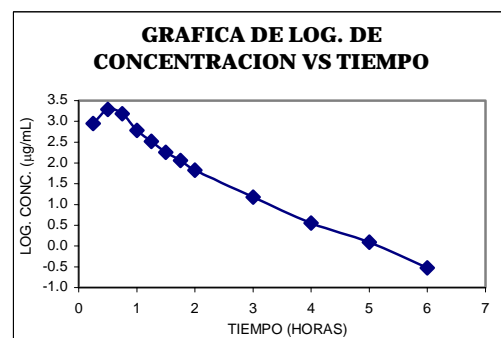
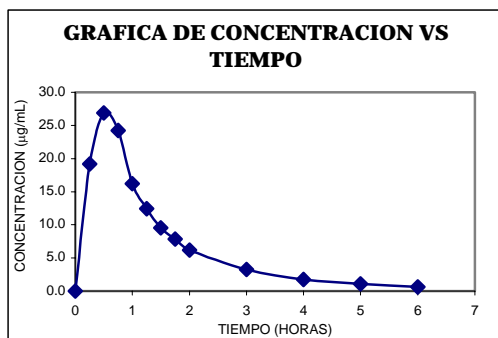
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	$35.25 \mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$
$ABC_{0-\infty}$	$35.8 \mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$
k_e	0.931 h^{-1}
$t_{1/2}$	0.744 h
$C_{\text{máx}}$	$25.05 \mu\text{g} / \text{mL}$
$T_{\text{máx}}$	0.5 h
k_a	7.085 h^{-1}



VOLUNTARIO 11

Voluntario 11	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	19.172
0.5	26.865
0.75	24.215
1	16.213
1.25	12.404
1.5	9.532
1.75	7.866
2	6.206
3	3.258
4	1.741
5	1.101
6	0.591
7	NC

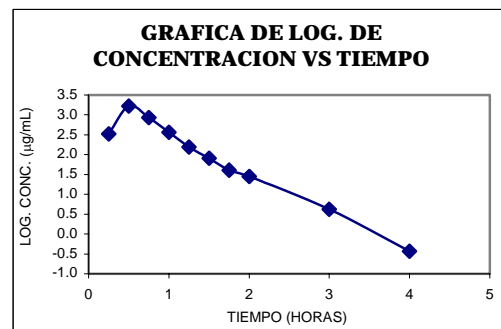
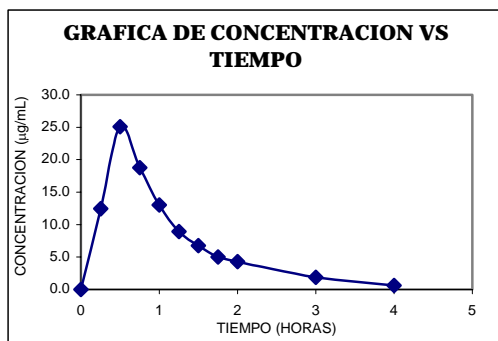
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	39.34 µg*h/mL
ABC _{0-∞}	40.22 µg*h/mL
ke	0.672 h ⁻¹
t _{1/2}	1.032 h
C _{máx}	26.86 µg/mL
T _{máx}	0.5 h
ka	-----



VOLUNTARIO 12

Voluntario 12	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	12.465
0.5	25.074
0.75	18.760
1	13.011
1.25	8.925
1.5	6.746
1.75	4.993
2	4.276
3	1.872
4	0.651
5	NC
6	ND
7	ND

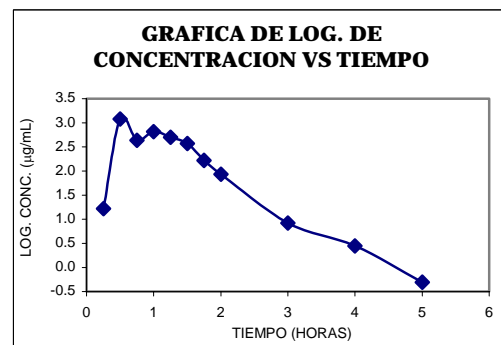
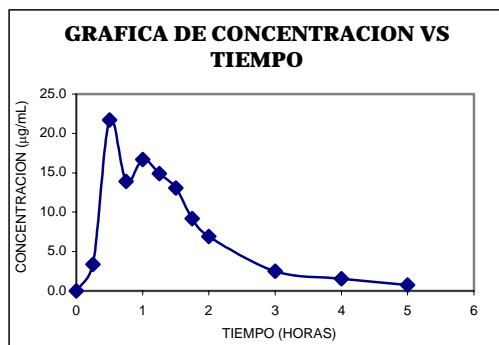
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	27.36 µg*h/mL
ABC _{0-∞}	28.02 µg*h/mL
ke	0.986 h ⁻¹
t _{1/2}	0.703 h
C _{máx}	25.07 µg/mL
T _{máx}	0.5 h
ka	-----



VOLUNTARIO 13

Voluntario 13	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	3.385
0.5	21.705
0.75	13.927
1	16.710
1.25	14.885
1.5	13.090
1.75	9.192
2	6.903
3	2.508
4	1.568
5	0.736
6	NC
7	NC

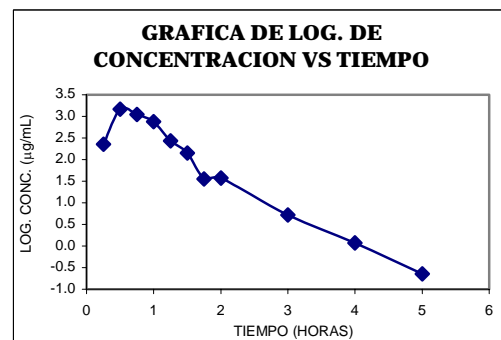
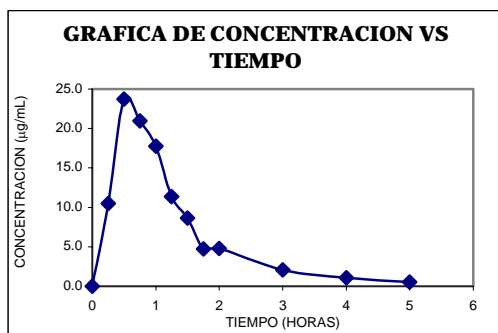
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	31.98µg*h/mL
ABC _{0-∞}	32.9 µg*h/mL
ke	0.8 h ⁻¹
t _{1/2}	0.866 h
C _{máx}	21.7 µg/mL
T _{máx}	0.5 h
ka	-----



VOLUNTARIO 14

Voluntario 14	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	5.814
0.5	19.548
0.75	26.024
1	20.872
1.25	14.659
1.5	11.489
1.75	7.350
2	8.167
3	4.074
4	2.130
5	0.956
6	0.513
7	0.358

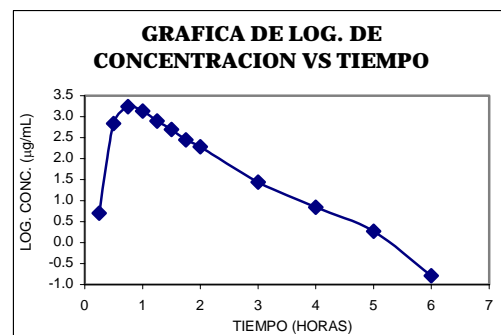
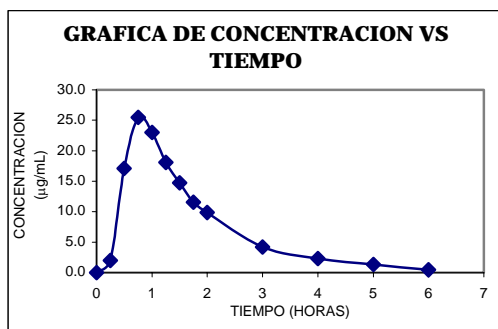
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	39.4 µg*h/mL
ABC _{0-∞}	39.91 µg*h/mL
ke	1.025 h ⁻¹
t _{1/2}	0.676 h
C _{máx}	26.02 µg/mL
T _{máx}	0.75 h
ka	-----



VOLUNTARIO 15

Voluntario 15	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	2.015
0.5	17.090
0.75	25.496
1	23.039
1.25	18.080
1.5	14.750
1.75	11.545
2	9.847
3	4.231
4	2.331
5	1.311
6	0.455
7	ND

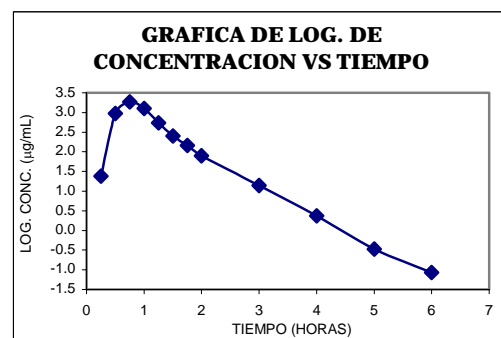
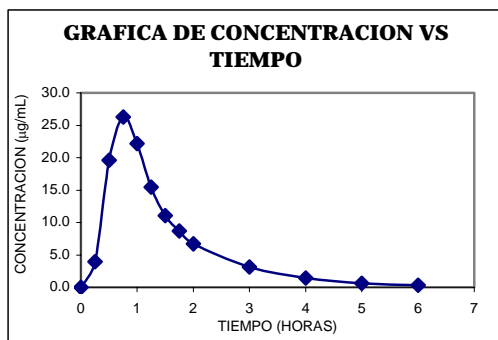
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	42.26 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	42.9 µg*h/mL
k_e	0.711 h ⁻¹
$t_{1/2}$	0.975 h
$C_{m\acute{a}x}$	25.5 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.75 h
k_a	3.730 h ⁻¹



VOLUNTARIO 16

Voluntario 16	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	3.238
0.5	17.814
0.75	23.000
1	21.284
1.25	15.900
1.5	12.479
1.75	9.464
2	8.029
3	3.198
4	1.468
5	0.511
6	0.321
7	ND

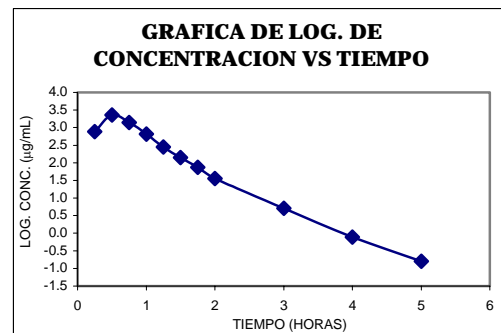
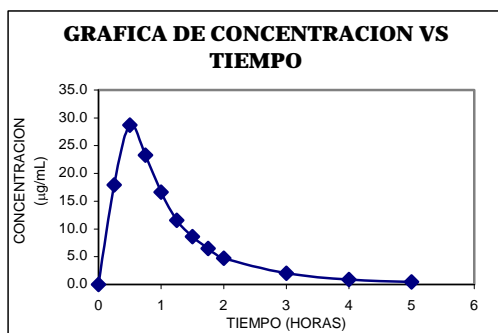
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	36.15 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	36.53 µg*h/mL
k_e	0.900 h ⁻¹
$t_{1/2}$	0.770 h
$C_{m\acute{a}x}$	23 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.75 h
k_a	5.287 h ⁻¹



VOLUNTARIO 17

Voluntario 17	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	17.920
0.5	28.708
0.75	23.263
1	16.654
1.25	11.578
1.5	8.598
1.75	6.495
2	4.722
3	2.034
4	0.891
5	0.450
6	ND
7	ND

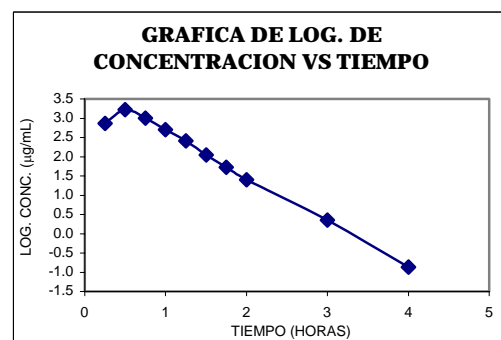
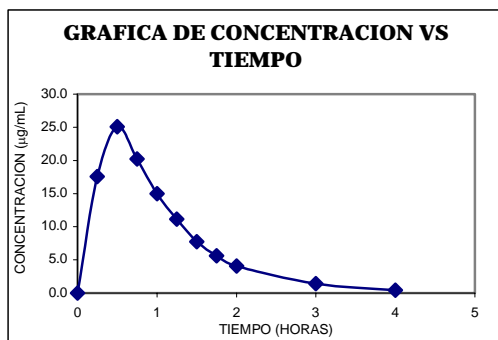
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	34.41 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	34.9 µg*h/mL
k_e	0.918 h ⁻¹
$t_{1/2}$	0.755 h
$C_{m\acute{a}x}$	28.71 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.5 h
k_a	-----



VOLUNTARIO 18

Voluntario 18	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	12.759
0.5	27.742
0.75	21.594
1	14.369
1.25	10.483
1.5	7.626
1.75	5.264
2	4.541
3	1.783
4	0.463
5	ND
6	ND
7	ND

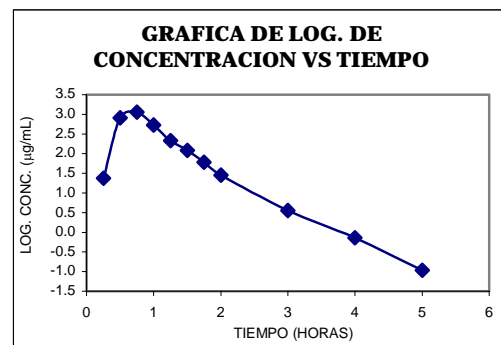
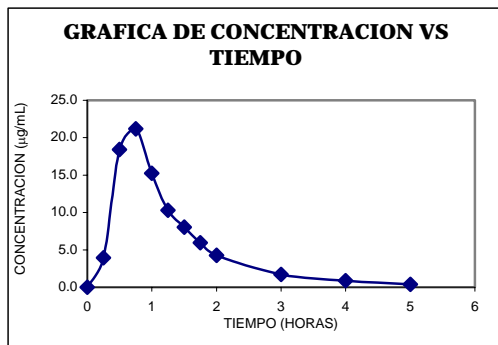
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	29.81 µg*h/mL
ABC _{0-∞}	30.22 µg*h/mL
ke	1.022 h ⁻¹
t _{1/2}	0.678 h
C _{máx}	27.74 µg/mL
T _{máx}	0.5 h
ka	-----



VOLUNTARIO 19

Voluntario 19	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	3.955
0.5	18.432
0.75	21.197
1	15.253
1.25	10.301
1.5	8.028
1.75	5.932
2	4.278
3	1.736
4	0.872
5	0.380
6	ND
7	ND

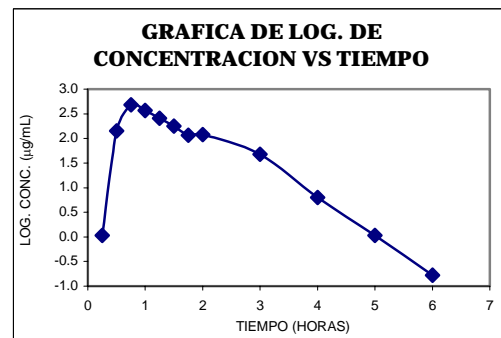
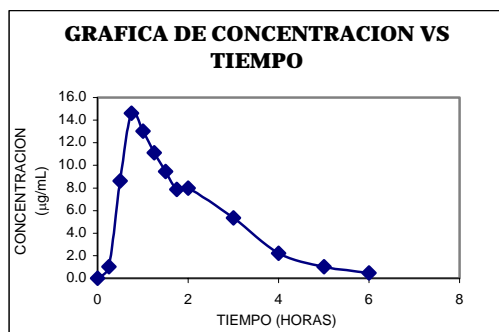
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	26.25 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	26.67 µg*h/mL
k_e	0.905 h ⁻¹
$t_{1/2}$	0.766 h
$C_{m\acute{a}x}$	21.2 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.75 h
k_a	8.519 h ⁻¹



VOLUNTARIO 20

Voluntario 20	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	1.031
0.5	8.624
0.75	14.620
1	13.026
1.25	11.122
1.5	9.465
1.75	7.889
2	8.000
3	5.342
4	2.227
5	1.032
6	0.459
7	NC

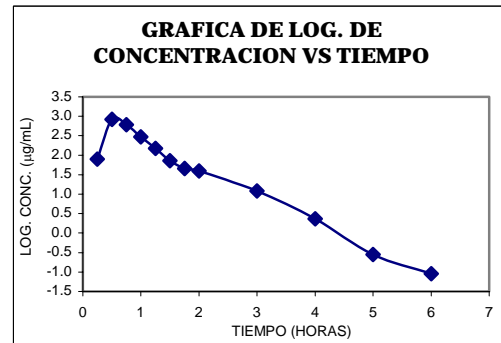
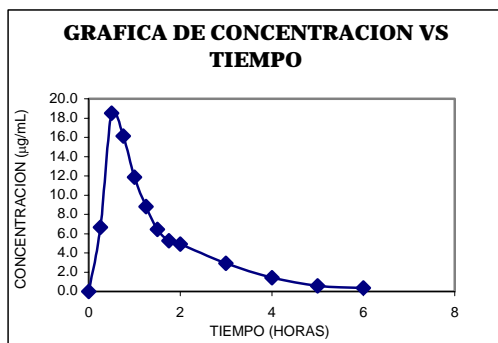
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	30.27 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	30.84 µg*h/mL
k_e	0.805 h ⁻¹
$t_{1/2}$	0.861 h
$C_{m\acute{a}x}$	14.62 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.75 h
k_a	2.877 h ⁻¹



VOLUNTARIO 21

Voluntario 21	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	6.665
0.5	18.490
0.75	16.141
1	11.877
1.25	8.799
1.5	6.434
1.75	5.271
2	4.918
3	2.937
4	1.438
5	0.577
6	0.352
7	NC

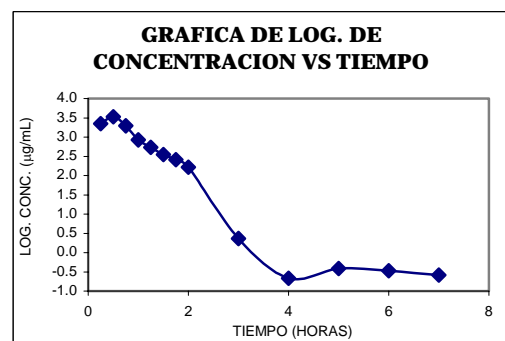
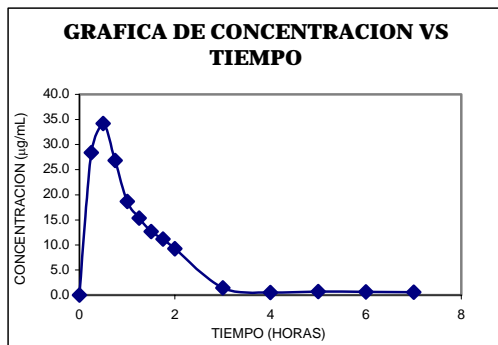
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	26.62µg*h/mL
ABC _{0-∞}	27.1 µg*h/mL
ke	0.733 h ⁻¹
t _{1/2}	0.945 h
C _{máx}	18.49 µg/mL
T _{máx}	0.5 h
ka	-----



VOLUNTARIO 22

Voluntario 22	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	28.407
0.5	34.201
0.75	26.864
1	18.673
1.25	15.350
1.5	12.690
1.75	11.197
2	9.222
3	1.441
4	0.514
5	0.662
6	0.625
7	0.559

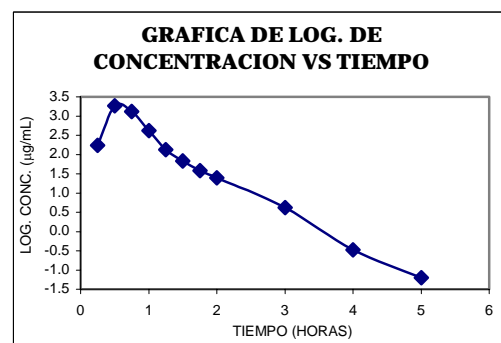
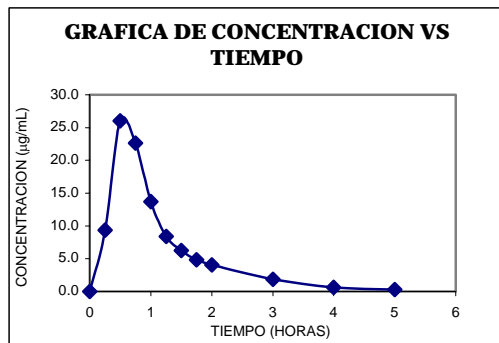
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	46.13 µg*h/mL
ABC _{0-∞}	46.57 µg*h/mL
ke	1.270 h ⁻¹
t _{1/2}	0.545 h
C _{máx}	34.2 µg/mL
T _{máx}	0.5 h
ka	-----



VOLUNTARIO 23

Voluntario 23	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	9.360
0.5	26.055
0.75	22.626
1	13.722
1.25	8.402
1.5	6.260
1.75	4.844
2	4.041
3	1.864
4	0.619
5	0.301
6	NC
7	ND

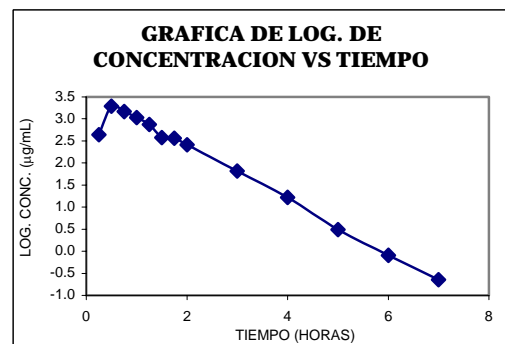
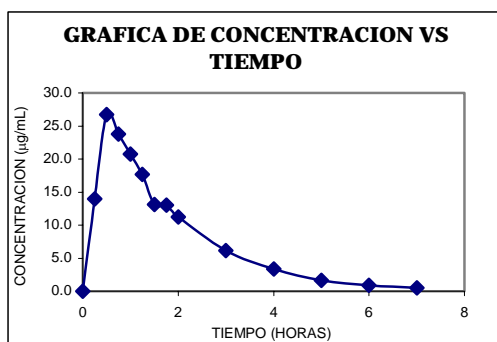
PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC _{0-t}	27.68 µg*h/mL
ABC _{0-∞}	28.0 µg*h/mL
ke	0.941 h ⁻¹
t _{1/2}	0.736 h
C _{máx}	26.05 µg/mL
T _{máx}	0.5 h
ka	-----



VOLUNTARIO 24

Voluntario 24	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0.000
0.25	13.994
0.5	26.746
0.75	23.806
1	20.756
1.25	17.672
1.5	13.127
1.75	13.012
2	11.211
3	6.155
4	3.381
5	1.637
6	0.912
7	0.525

PARÁMETRO	VALOR
Dosis	500 mg
ABC_{0-t}	51.53 µg*h/mL
$ABC_{0-\infty}$	52.39 µg*h/mL
k_e	0.610 h ⁻¹
$t_{1/2}$	1.135 h
$C_{m\acute{a}x}$	26.75 µg/mL
$T_{m\acute{a}x}$	0.5 h
k_a	-----



APÉNDICE IV

CONCENTRACIONES DE SUSPENSIÓN DE CEFALEXINA PARA CADA VOLUNTARIO A TIEMPOS DETERMINADOS														
Tiempo (h)	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2	3	4	5	6	7
Voluntario 1	0	16.559	30.649	27.703	22.315	15.996	11.881	9.753	9.090	5.163	2.998	1.286	0.787	0.447
Voluntario 2	0	0.446	8.196	15.475	14.839	11.568	9.057	7.484	5.681	4.976	2.229	0.919	0.466	NC
Voluntario 3	0	0.767	11.919	20.079	17.098	12.763	10.035	0.054	6.618	3.258	1.972	1.180	0.650	0.390
Voluntario 4	0	1.455	16.201	17.688	13.222	9.821	7.429	5.921	4.533	2.053	0.930	0.460	NC	ND
Voluntario 5	0	5.375	17.397	18.957	17.115	13.767	10.839	9.283	6.894	3.700	1.530	0.680	NC	ND
Voluntario 6	0	4.635	9.039	13.881	10.856	10.292	5.838	8.003	6.500	2.200	1.550	0.790	0.400	NC
Voluntario 7	0	2.132	15.106	19.249	17.944	14.565	11.509	9.384	7.960	4.460	1.740	0.850	0.450	NC
Voluntario 8	0	7.840	20.154	16.977	13.045	10.476	8.636	7.376	6.103	2.661	1.379	0.678	0.323	NC
Voluntario 9	0	2.769	13.350	17.597	15.398	12.023	8.810	6.670	5.980	2.860	1.310	0.610	NC	ND
Voluntario 10	0	7.495	21.273	22.384	17.169	12.730	9.660	8.500	6.520	2.680	1.140	0.510	NC	ND
Voluntario 11	0	14.454	24.642	18.912	13.630	9.480	7.330	5.840	4.740	2.440	1.330	0.700	0.350	ND
Voluntario 12	0	10.197	23.320	19.880	13.320	9.050	6.320	5.090	4.130	1.160	0.470	NC	ND	ND
Voluntario 13	0	6.028	10.830	19.830	13.390	8.400	6.770	5.550	4.540	1.960	0.850	0.450	NC	ND
Voluntario 14	0	10.520	23.740	20.970	17.730	11.380	8.630	4.720	4.800	2.040	1.080	0.520	NC	ND
Voluntario 15	0	ND	9.350	24.830	25.060	20.630	16.630	14.030	11.700	5.460	2.420	1.170	0.410	ND
Voluntario 16	0	3.970	19.610	26.300	22.160	15.470	11.050	8.682	6.700	3.140	1.450	0.630	0.342	ND
Voluntario 17	0	22.940	28.600	22.030	15.640	10.560	7.690	6.150	4.947	2.750	1.110	0.461	NC	ND
Voluntario 18	0	17.590	25.100	20.240	14.098	11.150	7.740	5.610	4.050	1.430	0.419	ND	ND	ND
Voluntario 19	0	3.900	17.220	17.640	13.960	11.160	9.090	6.370	4.420	2.109	0.874	0.401	ND	ND
Voluntario 20	0	10.755	18.850	18.570	14.690	11.760	9.640	7.480	6.420	2.922	1.385	0.583	0.310	NC
Voluntario 21	0	1.930	12.220	14.630	11.760	8.880	7.600	6.442	5.604	3.995	2.135	0.948	0.538	0.308
Voluntario 22	0	6.090	25.930	25.760	17.740	12.784	8.960	7.209	5.255	2.344	1.045	0.427	NC	ND
Voluntario 23	0	5.630	26.700	22.090	14.230	9.493	6.892	5.169	4.087	1.776	0.699	0.350	NC	ND
Voluntario 24	0	18.430	29.670	28.550	22.451	17.475	13.656	11.037	9.198	4.565	2.465	1.184	0.696	0.489

**APÉNDICE V
EVALUACIÓN ESTADÍSTICA**

**ESTADÍSTICA PARA EVALUAR LAS DIFERENCIAS DE GÉNERO
ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL ABC 0-t**

One Way Analysis of Variance Thursday, October 20, 2005, 21:08:05

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed ($P > 0.200$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.540$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ABC 0- t HOMBRE	12	0	34.498	7.636	2.204
ABC 0-t MUJERES	12	0	35.208	8.142	2.350

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	3.018	3.018	0.0484	0.828
Residual	22	1370.494	62.295		
Total	23	1373.512			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.828$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

PRUEBA DE t PARA ABC 0-t (DIFERENCIAS DE GÉNERO)

t-test Thursday, October 20, 2005, 20:49:30

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.540)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ABC 0- t HOMBRE	12	0	34.498	7.636	2.204
ABC 0-t MUJERES	12	0	35.208	8.142	2.350

Difference -0.709

t = -0.220 with 22 degrees of freedom. (P = 0.828)

95 percent confidence interval for difference of means: -7.392 to 5.973

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.828).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

ANALISIS DE VARIANZA PARA EVALUAR LA DIFERENCIA DE GENERO (ABC 0-inf)

One Way Analysis of Variance Thursday, October 20, 2005, 20:52:05

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.545)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ABC 0-inf HOM	12	0	35.148	7.646	2.207
ABC 0- INF MUJ	12	0	35.744	8.223	2.374

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	2.136	2.136	0.0339	0.856
Residual	22	1386.879	63.040		
Total	23	1389.015			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.856$).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

PRUEBA DE t PARA EVALUAR LA INFLUENCIA DE GÉNERO (ABC 0-inf)

t-test Thursday, October 20, 2005, 20:56:36

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed ($P > 0.200$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0.545$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ABC 0-inf HOM	12	0	35.148	7.646	2.207
ABC 0- INF MUJ	12	0	35.744	8.223	2.374

Difference -0.597

t = -0.184 with 22 degrees of freedom. ($P = 0.856$)

95 percent confidence interval for difference of means: -7.319 to 6.126

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.856).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

ANALISIS DE VARIANZA PARA EVALUAR LA INFLUENCIA DE GENERO (C_{MAX})

One Way Analysis of Variance Thursday, October 20, 2005, 20:57:47

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.762)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C MAX HOM	12	0	23.016	5.945	1.716
C MAX MUJ	12	0	24.498	5.115	1.477

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	13.187	13.187	0.429	0.519
Residual	22	676.556	30.753		
Total	23	689.742			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.519).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

PRUEBA DE t PARA EVALUAR LA INFLUENCIA DE GENERO (C_{MAX})

t-test Thursday, October 20, 2005, 20:59:58

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.762)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C MAX HOM	12	0	23.016	5.945	1.716
C MAX MUJ	12	0	24.498	5.115	1.477

Difference -1.483

t = -0.655 with 22 degrees of freedom. (P = 0.519)

95 percent confidence interval for difference of means: -6.178 to 3.213

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.519).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

**ANALISIS DE VARIANZA PARA EVALUAR LA INFLUENCIA DE GÉNERO
(t_{1/2})**

One Way Analysis of Variance Thursday, October 20, 2005, 21:03:05

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.477)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
t 1/2 HOM	12	0	0.927	0.127	0.0368
t 1/2 MUJ	12	0	0.833	0.166	0.0480

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0523	0.0523	2.383	0.137
Residual	22	0.483	0.0219		
Total	23	0.535			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.137).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.191

The power of the performed test (0.191) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

PRUEBA DE t PARA EVALUAR LA INFLUENCIA DE GÉNERO (t_{1/2})

t-test Thursday, October 20, 2005, 21:04:44

Data source: Data 1 in Notebook

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.477)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
t 1/2 HOM	12	0	0.927	0.127	0.0368
t 1/2 MUJ	12	0	0.833	0.166	0.0480

Difference 0.0933

$t = 1.544$ with 22 degrees of freedom. ($P = 0.137$)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.0321 to 0.219

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups ($P = 0.137$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.191

The power of the performed test (0.191) is below the desired power of 0.800. You should interpret the negative findings cautiously.

1. BIBLIOGRAFÍA

1. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas; Diario Oficial de la Federación, Primera Sección, Viernes 7 de mayo de 1999.
2. Clive P. Page PhD; Farmacología Integrada; Ed. Harcourt Brace; España; 1998 Edición en Español; pp. 1-83.
3. Hardman Joel G.; Godman y Gilman; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; Ed. McGraw-Hill Interamericana; Novena Edición; 1996; E.U.; pp. 1220-1233.
4. Jawetz E.; Microbiología Médica; Ed. El Manual Moderno, S. A. de C. V.; Decimocuarta Edición; México D.F. 1992; pp.159-160.
5. Merk & Co. Inc.; The Merck Index Chemical. Drugs and Biologics; Ed. 12º 1996; p.p. 328; Numero 2021.
6. Gennaro Alfonso R.; Remington Farmacia; Editorial Médica Panamericana; 19ª Edición; pp. 1966-1967.
7. O'Callghan C.H.; J. Pharm. Pharmac. 23: 50; 1971.
8. Vademécum Farmacéutico IPC; Información Profesional Especializada S.A. de C.V.; 10a Edición; Rezza Editores S.A.
9. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas DEF; Ediciones PLM; México D. F. 2003
10. United States Pharmacopeia; USP XX/NF15 (1980).
11. Tsukinaka Yamana; J. Pharm. Sci. 65 : 1563 (1976).
12. Robert L. Grob; Chromatographic Analysis of the Environment; Ed. New York and Basel; Second Edition.
13. Douglas A. Skoog; Análisis Instrumental, Ed. McGraw -Hill; Cuarta Edición.
14. McAteer J. A.; Clinical Chemistry 33/10 (1987); pp.1788-1790.
15. Welling PG; J Chromatography 225(2): 532-8; 1981 Oct 9.

16. Jean B. Lecaillon; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Nov. 1980, Vol 18 No. 4, pp. 656-660.
17. Claude M.; Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39 (1); Jan. 1995; p.p. 94-98.
18. Katzung, Farmacología Básica y Clínica; Ed. El Manual Moderno; 7ª Edición; pp. 45; 1999.
19. Litter; Farmacología Experimental Clínica; 5º Edición (15588-1564); Ed. El Ateneo; 1983.
20. Martindale. The Extrapharmacopoeia. XXIX Edición; pp. 105 - 173.
21. Yu A.B. C.; J. Pharm. Sci. 66: 213; 1977.
22. Barbhaya, R. H. Turner; J. Pharm. Pharmac. 28: 791; 1976.
23. Peckering W. T.; Química Analítica Moderna I; Editorial Reverte, S. A.; 1981.
24. Marrelli L. P.; J. Pharm. Sci. 61: 1647; 1972.
25. Bryan G. Reuben; Pharmaceutical Chemicals in Perspective; Ed. Jhon Wiley & sons, Inc.; 1989; U.S.A.
26. Mickey C. Smith; Pharmaceutical Marketing in the 21st Century; Ed. The Harworh Press; 1996; U.S.A.
27. Frederick J. Carleton; Validation of Aseptic Pharmaceutical Process; Ed. Macel Dekker, Inc; 1986; N.Y., E.U.
28. Jhon Happel; Economía de los Procesos Químicos; Ed. Reverte S. A; 1998; España.
29. Robert V. Smith; Textbook of Biopharmaceutic Analysis; Ed. Lea & Febiger; 1981; USA.
30. Kenneth A. Connors; Curso de Análisis Farmacéutico; Ed. Reverte, S. A.; 1981; Barcelona, España; pp. 674-678.
31. CFR 21 (1992) p.p. 526. (PART440) 442.127 / a,b,c.
32. Unite States Pharmacopeia; USP XXIII/NF18 pp. 320-321.
33. Clarke's Isolation and Identification of Drugs; 1986; pp. 438.

34. Hernández H. Francisca; Estudio de Bioequivalencia de Monohidrato de Cefalexina; Tesis Mancomunada de Licenciatura; Facultad de Química; 1986; UNAM.
35. Martindale; The Extrapharmacopeia; XXVII Edición; pp. 1095-1097.