



# **UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO**

**MAESTRÍA EN QUÍMICA**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO POR RP-HPLC-DAD PARA  
LA DETERMINACIÓN DE SULFADIAZINA Y SULFADOXINA EN  
SUERO DE NIÑOS CON TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA EN EL  
DEPARTAMENTO DEL QUINDÍO**

**CHARLI ROSE PARRA, Qco.**

**Armenia, Mayo de 2014**



# UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

**MAESTRÍA EN QUÍMICA**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO POR RP-HPLC-DAD PARA  
LA DETERMINACIÓN DE SULFADIAZINA Y SULFADOXINA EN  
SUERO DE NIÑOS CON TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA EN EL  
DEPARTAMENTO DEL QUINDÍO**

**CHARLI ROSE PARRA, Qco.**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:  
Magíster en Química.

**Jorge Enrique Gómez Marín M.D., Ph.D.**  
Director  
Universidad del Quindío.

**Gonzalo Taborda Ocampo Qco., M.Sc., Ph.D.**  
Director  
Universidad de Caldas.

**Armenia, Mayo de 2014.**



*A mi madre  
María Danelly Parra P.*

*A la memoria del ser más especial del mundo  
mi abuela Teresa Palacio.*

*A mi familia, por su apoyo constante.*



## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por darme fortaleza para continuar en los momentos de adversidad y no renunciar a los retos emprendidos.*

*A mi madre que siempre me animo a no desfallecer y decir que faltaba poco para terminar.*

*A mi familia por su apoyo incondicional y creer que se podía.*

*A las Maestrías en Química y Biomédicas de la Universidad del Quindío, por haberme permitido realizar en estas casas el presente trabajo de tesis.*

*Al Dr. Jorge Enrique Gómez Marín, por haber dirigido el presente trabajo de tesis, por las oportunidades brindadas, los conocimientos compartidos, la confianza depositada y hacerme sentir que todos hacemos parte del mismo equipo.*

*Al Dr. Gonzalo Tabora Ocampo, y colaboradores de la Universidad de Caldas, por su invaluable colaboración, con el Laboratorio de Cromatografía, su apoyo incondicional, sus orientaciones académicas, su calidad humana y creer que se podía sacar adelante el proyecto.*

*Al Dr. Henry Reyes, director de la Maestría en Química de la Universidad del Quindío, por ser esa persona que siempre está para ayudar y mostrar el camino para seguir adelante y por su gran profesionalismo. Gracias Henry.*

*A la Dra. Eunice, ex directora de la maestría en Química, por dinamizar la maestría para aquellos que no trabajamos en la Universidad pudiésemos estar ahí.*

*Al Dr. Pedro Néel Martínez Yépez, por todos su apoyo y aliento desde siempre para lograr las metas propuestas, por su conocimientos compartidos y por su amistad verdadera.*

*Al MSc. John Alexander Rodríguez, por su impulso para iniciar y terminar la presente cruzada.*

*A mis amigos y todas esas personas e instituciones que no alcanzo a mencionar, pero que fueron fundamentales para el logro del objetivo propuesto.*



## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>23</b>
<b>INCIDENCIA DE LA TOXOPLASMOSIS EN LA SALUD</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>24</b>
2.2.2 Aspectos históricos .....	25
2.2.3 Epidemiología .....	32
2.2.4 Agente etiológico .....	35
2.2.5 Toxoplasmosis y el embarazo .....	39
2.2.6 Métodos de Diagnóstico .....	47
2.2.7 Principales técnicas usadas para la detección de la actividad del parásito ( <i>Toxoplasma gondii</i> ), sus antígenos y/o su ADN .....	53
2.2.8 Determinación de anticuerpos específicos .....	55
2.2.9 Objetivos del control de la toxoplasmosis en la gestante .....	56
<b>2.3 TRATAMIENTO Y DOSIFICACIÓN</b> .....	<b>57</b>
2.3.1 Datos de medicación. En evidencia o sospecha de toxoplasmosis congénita en recién nacidos .....	59
2.3.2 Sinergismo farmacológico de SDX-PYR .....	64
<b>2.4 PROCESO DE IMPLEMENTACIÓN</b> .....	<b>66</b>
2.4.1 Comprobación de los atributos del procedimiento de análisis .....	66
2.4.2 Respuesta terapéutica .....	71
<b>2.5 CONCLUSIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>74</b>
<b>DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO RP-HPLC-DAD PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN SUERO Y PLASMA SANGUÍNEO</b> .....	<b>74</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>75</b>
<b>3.2 METODOLOGÍA</b> .....	<b>76</b>
3.2.1 Selección de fármacos (analitos) .....	76



3.2.2 Condiciones cromatográficas .....	77
3.2.3 Estándares y reactivos .....	78
3.2.4 Curvas de calibración.....	81
<b>3.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
3.3.1 Análisis cualitativo.....	85
<b>3.4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>96</b>
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>98</b>
<b>VERIFICACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR RP-HPLC CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS (DAD) PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN SUERO Y PLASMA SANGUÍNEO.....</b>	<b>98</b>
<b>4.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>4.2 METODOLOGÍA.....</b>	<b>100</b>
4.2.1 Linealidad .....	100
4.2.2 Precisión .....	100
4.2.3 Selectividad. ....	102
4.2.4 Exactitud.....	103
4.2.5 Sensibilidad .....	105
<b>4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>106</b>
4.3.1 Linealidad .....	106
4.3.2 Precisión.....	111
4.3.3 Selectividad .....	115
4.3.4 Exactitud.....	119
4.3.5 Sensibilidad .....	121
<b>4.4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>123</b>
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>124</b>
<b>EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FÁRMACOS EN SUERO SANGUÍNEO DE NIÑOS CON TC .....</b>	<b>124</b>
<b>5.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>125</b>
<b>5.2 METODOLOGÍA.....</b>	<b>125</b>
5.2.1 Localización geográfica.....	125
5.2.2 Muestreo.....	126
5.2.3 Purificación de los fármacos. ....	128



5.2.5 Cuantificación de fármacos .....	128
5.2.6. Correlación nivel de Hb vs SDX residual.....	129
5.2.7. Correlación nivel de IgG vs SDX residual.....	130
5.2.8 Estabilidad de las tabletas de Falcidar (SDX-PYR) comerciales .....	130
5.2.9 Incidencia de la matriz de disolución.....	131
5.2.10 Análisis de datos .....	131
<b>5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>132</b>
5.3.1 Muestreo.....	132
5.3.1 Cuantificación de Fármacos.....	135
5.3.2 Correlación del nivel de Hb vs SDX residual .....	136
5.3.3 Correlación Hb vs título de IgG .....	141
5.3.4 Correlación nivel de IgG vs SDX residual.....	143
5.3.5 Estabilidad de las tabletas de Fancidar (SDX-PYR) comerciales .....	148
5.3.6 Incidencia de la matriz de disolución.....	149
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>154</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>154</b>
<b>CAPÍTULO 7.....</b>	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>157</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>164</b>



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Consecuencias fetales por TC, según trimestre de gestación. ....	45
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los fármacos de estudio. ....	76
Tabla 3. Condiciones cromatográficas para la determinación de SDX y SDZ. ....	78
Tabla 4. Materiales y equipos utilizados en la toma de muestras de suero, almacenamiento y procesamiento. ....	79
Tabla 5. Elaboración curva patrón SDX-SDZ de 120 (ug/ml). ....	82
Tabla 6. Elaboración curva patrón SDX-SDZ de 300 (ug/ml). ....	82
Tabla 7. Curva patrón del método en matriz suero. ....	83
Tabla 8. Preparación curva de calibración estándar en metanol (Fase móvil) grado HPLC. ....	84
Tabla 9. Preparación curva calibración estándar en plasma. ....	84
Tabla 10. Preparación Curva de Calibración en Suero con PYR-SDX (similar curva patrón estándar). ....	85
Tabla 11. Comparación de los tiempos de retención de los antibióticos en solución individual y en la mezcla. ....	86
Tabla 12. Áreas obtenidas del patrón sulfadiazina para la linealidad del sistema. ....	89
Tabla 13. Áreas obtenidas del patrón sulfadoxina para la linealidad del sistema. ....	89
Tabla 14. Áreas obtenidas del patrón sulfadiazina para las curvas de calibración. ....	92
Tabla 15. Áreas obtenidas del patrón sulfadoxina para las curvas de calibración. ....	93
Tabla 16. Análisis de varianza. ....	105
Tabla 17. Resultados de coeficientes de correlación, ecuación de regresión y límites de confianza para los fármacos analizados en el estudio presente. ....	107
Tabla 18. Resultados obtenidos en el test estadístico ( <i>t- Student</i> ) para los fármacos en estudio. ....	109
Tabla 19. Análisis de residuos (homocedasticidad) para sulfadoxina (Sistema). ....	109
Tabla 20. Análisis de residuos (homocedasticidad) para sulfadoxina (método). ....	110
Tabla 21. Análisis de residuos (homocedasticidad) para sulfadiazina (método). ....	110
Tabla 22. Análisis de residuos (homocedasticidad) para sulfadiazina (sistema). ....	110
Tabla 23. Áreas obtenidas en concentración en tres niveles para estándar de sulfadiazina (Repetibilidad instrumental). ....	111
Tabla 24. Áreas obtenidas en concentración en tres niveles para estándar de sulfadoxina (Repetibilidad instrumental). ....	111
Tabla 25. Porcentajes de recuperación obtenidos en el dopaje de la matriz suero con sulfadiazina (Repetibilidad del método). ....	112





Tabla 26. Porcentajes de recuperación obtenidos en el dopaje de la matriz suero con sulfadoxina (Repetibilidad del método). .....	112
Tabla 27. Resumen de los porcentajes de recuperación obtenidos en el dopaje de la matriz suero con los fármacos de experimentación con sus respectivos %RSD (Repetibilidad del método). .....	113
Tabla 28. Áreas obtenidas para el fármaco sulfadoxina, en muestras reales de estudio durante dos días diferentes para evaluar la reproducibilidad. ....	113
Tabla 29. Porcentajes de recuperación obtenidos para la sulfadoxina en estudio para la evaluación de la exactitud. ....	119
Tabla 30. Porcentajes de recuperación obtenidos para la sulfadiazina en estudio para la evaluación de la exactitud. ....	119
Tabla 31. Límites de detección y cuantificación para SDZ y SDX. ....	122
Tabla 32. Concentración de SDX en $\mu\text{g/mL}$ y datos históricos clínicos de IgG y Hb en suero de niños con TC en el Departamento del Quindío. ....	134
Tabla 33. Variación del nivel de Hemoglobina (Hb) vs Sulfadoxina (SDX) residual en suero. ...	137
Tabla 34. Variación del nivel de Hemoglobina (Hb) vs nivel de inmunoglobulina (IgG) en suero. ....	142
Tabla 35. Concentración de SDX en suero vs Nivel de IgG. Paciente A. ....	144
Tabla 36. Concentración de SDX en suero vs Nivel de IgG. Paciente B. ....	146
Tabla 37. Porcentajes de recuperación y tiempos de retención, para análisis de estabilidad de los fármacos en tabletas de Falcidar comercial. ....	148
Tabla 38. Incidencia de la matriz de disolución del método SDX/suero. ....	150
Tabla 39. Incidencia de la matriz de disolución del método SDZ/suero. ....	151



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fuente de la infección por <i>T. gondii</i> en los seres humanos.....	24
Figura 2. Origen cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	25
Figura 3. Esquema epidemiológico de la Toxoplasmosis. ....	33
Figura 4. Nueva clasificación de Eucariotas.....	34
Figura 5. Formas parasitarias del <i>Toxoplasma gondii</i> , taquizoito (izquierda), quiste con bradizoitos (centro), y ooquistes (derecha).....	36
Figura 6 Componentes celulares del <i>Toxoplasma gondii</i> . ....	37
Figura 7. Ciclo biológico del <i>Toxoplasma gondii</i> . ....	38
Figura 8. Tomografía cerebral de niños con TC, sin tratamiento prenatal.....	42
Figura 9. Tomografía cerebral de niños con TC, con tratamiento prenatal.....	42
Figura 10. Primer caso de hidranencefalia 2009 – Armenia HUSJD. ....	43
Figura 11. Niño con TC. Foto tomada por enfermera de turno en URN (24/07/12), Servicio de Urgencias Hospital Universitario San Juan de Dios, Armenia – Quindío. ....	43
Figura 12. Radiografía de tórax (Hepatomegalia). ....	44
Figura 13. Ecografía abdominal. (Hepatomegalia moderada). ....	44
Figura 14. Daño ocular fetal por TC. ....	44
Figura 15. Conceptos de riesgo de transmisión y secuelas para el niño con TC. ....	45
Figura 16. Relación infección fetal - severidad.....	46
Figura 17. Anticuerpos desde la primoinfección.....	51
Figura 18. Flujograma de atención para el diagnóstico y tratamiento de la (TC) durante el embarazo. ....	52
Figura 19. Esquema de tratamiento para TC, según la sociedad española de infectología pediátrica.....	58
Figura 20. Obtención de la sulfanilamida. ....	61
Figura 21. Estructura química de la sulfanilamida.....	61
Figura 22. Sulfadoxina.....	63
Figura 23. Sulfadiazina. ....	63
Figura 24. Pirimetamina.....	64
Figura 25. Pasos en el metabolismo del folato bloqueados por las sulfonamidas, y análogos de la dihidropteridina (trimetoprima y la pirimetamina). ....	65
Figura 26. Cromatograma de una solución de suero control positivo con soluciones de 300 µg/mL de SDX, 200 µg/mL de SDZ, y 200 µg/mL de PYR.....	86
Figura 27. Curva de calibración sulfadiazina (Linealidad del sistema). ....	94
Figura 28. Curva de calibración sulfadoxina (Linealidad del sistema). ....	95
Figura 29. Curva de calibración para sulfadiazina (Linealidad método). ....	95



Figura 30. Curva de calibración para sulfadoxina (Linealidad del sistema).....	96
Figura 31. Procedimiento para la extracción y purificación de antibióticos.....	101
Figura 32. Selección longitud de onda. ....	115
Figura 33. Cromatogramas de suero (matriz) individuo 1 (arriba) e individuo 2 (abajo).....	116
Figura 34. Cromatograma de matriz plasma individuo 1.....	116
Figura 35. Cromatogramas reactivos (Izquierda) metanol grado HPLC. (Sin picos interferentes), (Derecha) HClO <sub>4</sub> (5 % v/v) – agente precipitante de proteínas. ....	117
Figura 36. Cromatogramas estándares: a) SDZ 516µg/ml; b) SDX 530µg/ml; c) mezcla SDZ-SDX en suero 130µg/ml y d) mezcla de SDZ-SDX en plasma 50 µg/ml. ....	118
Figura 37. Mapa político del Departamento del Quindío, con ampliación en el mapa nacional.	126
Figura 38. Rose Parra Ch. Fotografía del sistema cromatográfico RP-HPLC-DAD (2013).....	128
Figura 39. Análisis 1 muestra paciente A, 19/10/2012 (a), análisis 2 muestra paciente A, 09/02/2013 (b).....	135
Figura 40. Gráfico Q-Q normal para la Hemoglobina en suero obtenido mediante el SPSS. ..	138
Figura 41. Gráfico Q-Q normal para la Sulfadoxina en suero obtenido mediante el SPSS.....	138
Figura 42. Variación del nivel de Hemoglobina (g/dL) vs SDX (mg/mL).....	139
Figura 43. Variación del nivel de Hemoglobina (g/dL) vs IgG (UI/mL).....	143
Figura 44. Variación del nivel de IgG vs. SDX. Paciente A.....	144
Figura 45. Variación del nivel de IgG vs. SDX. Paciente B.....	146
Figura 46. Rectas de calibración para estándares de sulfadoxina (SDX) en matrices diferentes. .....	152
Figura 47. Rectas de calibración para estándares de sulfadiazina (SDZ) en matrices diferentes. .....	152



## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Curva de calibración para Sulfadiazina (método).....	165
Anexo 2 Curva de calibración para Sulfadoxina (método).....	166
Anexo 3 Plantilla de excel - Quimiometría.....	167
Anexo 4 Distribución de $t$ para diferentes niveles de confianza.....	168
Anexo 5. Tabla de valores de distribución F (0,05).....	169
Anexo 6. Cromatogramas curva patrón - 300 ug/mL.....	170



## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de los fármacos sulfadoxina (SDX) y sulfadiazina (SDZ) en suero de niños infectados con toxoplasmosis congénita (TC), en el departamento del Quindío. Para ello, se implementó un procedimiento metodológico que posibilitara la cuantificación de los fármacos mediante RP-HPLC, acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD). Se evaluaron los atributos de: linealidad, precisión, exactitud, selectividad, límite de detección y límite de cuantificación con la finalidad de estimar el grado de confianza que brinda el análisis propuesto. De igual manera, se evaluó otro atributo secundario de calidad como la estabilidad de los medicamentos, y se realizaron algunos ensayos en varias soluciones con el fármaco (SDX), para observar variaciones en su determinación por el instrumento, para aproximarse a una valoración de la correlación entre los niveles de fármacos en suero sanguíneo, y los niveles de hemoglobina, e IgG anti-*Toxoplasma* durante el tratamiento de niños con (TC). El método fue reproducible, con alta robustez y un límite de detección congruente al reportado por otros estudios (1, 2). Su aplicación en sueros de niños bajo tratamiento permitió comparar los niveles con la respuesta clínica y la evolución de anticuerpos. Este método puede ser utilizado para el seguimiento de los niños con toxoplasmosis congénita.

Palabras clave: Toxoplasmosis congénita, RP-HPLC-DAD, sulfadoxina, sulfadiazina, inmunoglobulinas, hemoglobina.



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the presence of the drug sulfadoxine (SDX) and sulfadiazine (SDZ) in serum infected with congenital toxoplasmosis (CT), in the department of Quindío children. For this purpose, a methodological procedure that enabled the quantification of drugs by RP -HPLC coupled to a diode array detector (DAD) was implemented. Linearity, precision, accuracy, selectivity, limit of detection and limit of quantification in order to estimate the degree of confidence that the proposed analysis provides: attributes were evaluated. Similarly, another secondary attribute of quality and stability of the drug was evaluated in several trials and some solutions to the drug (SDX ) were performed to observe changes in their determination to the instrument, to approach an assessment of the correlation between drug levels in blood serum, and hemoglobin levels, and IgG anti -Toxoplasma during treatment of children with (TC). The method was reproducible, with high strength and consistent limits reported by other studies (1, 2) detection. Its application in blood serum of children under treatment is possible to compare levels with clinical response and the development of antibodies. This method can be used for monitoring of children with congenital toxoplasmosis.

Keywords: Congenital Toxoplasmosis, RP-HPLC-DAD, sulfadoxine, sulfadiazine, immunoglobulins, hemoglobin.



## ACRÓNIMOS.

RP-HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa acoplada a un detector de arreglo de diodos.
TC	Toxoplasmosis congénita.
SDX	Sulfadoxina
SDZ	Sulfadiazina
PYR	Pirimetamina
IgG	Inmunoglobulina G
Hb	Hemoglobina
$t_r$	Tiempo de Retención
$H_0$	Hipótesis nula
$H_1$	Hipótesis alterna
SD	Desviación estándar
RSD (%)	Desviación estándar relativa expresada en porcentaje
CV (%)	Coefficiente de variación expresado como porcentaje
$R^2$	Coefficiente de correlación
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
H.U.S.J.D.	Hospital Universitario San Juan de Dios



# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**





La toxoplasmosis congénita (TC) es una infección que por sus rasgos y síntomas, tradicionalmente se agrupa dentro de las llamadas TORCH (3, 4) y que ocasiona inmensos daños a nivel de la salud mental y ocular de los niños del país, así como a escala global, y en diferentes niveles de afectación, según las condiciones socioeconómicas y geográficas de la población, donde, muchos de los niños afectados sufren de retardo psicomotor, epilepsia, ceguera congénita, aborto espontáneo, prematuridad e incluso la muerte (3, 5-10). Dicha situación se deriva de la falta de programas de control integrales específicos para toxoplasmosis congénita, que tengan amplia cobertura y seguimiento durante el embarazo al mayor número de mujeres y a recién nacidos (6, 11-13).

### **Pregunta de investigación:**

¿Se podrá determinar la farmacocinética de los medicamentos empleados para el tratamiento de niños con toxoplasmosis congénita como: sulfadoxina, pirimetamina y sulfadiazina, por RP-HPLC-DAD, en las condiciones experimentales locales y nacionales?

Es primordial generar mayor conocimiento sobre la farmacocinética de los medicamentos empleados para el tratamiento de la infección parasitaria producida por el *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis), que resulta ser la antroponosis más difundida que se conoce en el mundo (5, 14), siendo severa cuando se adquiere durante el embarazo, dando lugar a la (TC) (15), ya que se reportan muchos tratamientos antiparasitarios, que incluyen combinaciones de la pirimetamina (PYR), y una sulfonamida sulfadiazina (SDZ) o sulfadoxina (SDX), entre otras combinaciones, antibióticos que tienen un efecto sinérgico (14, 16-18), tratamientos que reducen significativamente la probabilidad de aparición de secuelas en los niños infectados (15).

Sin embargo, algunos estudios sugieren que la extrapolación de resultados de la eficacia antimicrobiana *in vitro* y en animales de la PYR y la SDX, para determinar un rango objetivo de concentraciones, puede ser engañosa (15, 17, 18), ya que se debe considerar la amplia variabilidad interindividual de los niveles de los medicamentos en plasma, ya que incluso pacientes que recibieron



la misma dosis normalizada por peso corporal de medicamento presentaron respuestas terapéuticas diferentes (15).

En otros trabajos se reportan efectos teratogénicos cuando se usa PYR–SDZ, durante el primer trimestre del embarazo y se menciona la aparición de lesiones oculares con igual tratamiento aunque en un porcentaje bajo (3,4), e incluso, la poca o nula acción de la PYR–SDZ sobre la forma quística del parásito *Toxoplasma gondii* (10), sin tener en consideración que muchas veces solo la presencia de antibióticos y/o quimioterapéuticos como las sulfamidas pueden provocar hipersensibilización en los pacientes, causando en algunos casos reacciones alérgicas, trastornos gastrointestinales y erupciones en la piel, entre otros efectos secundarios sin relación a la dosificación de los medicamentos (19). Dada la situación, resulta imperativo hacer todos los esfuerzos que apunten a la detección preconcepcional, y la tamización universal para las gestantes, situación que si ocurre en países desarrollados donde las tasas de prevalencia y las complicaciones son mucho más bajas que las colombianas (20).

Dada la alta incidencia de toxoplasmosis en individuos con SIDA, en los últimos años se ha incrementado la atención sobre las propiedades fisiopatológicas del *Toxoplasma gondii* (10).

Si se tiene en consideración el papel fundamental que tiene los niveles de anticuerpos específicos IgG, IgM, IgA, e IgE para toxoplasmosis, y en particular la IgG, por su comportamiento durante las diferentes etapas de la infección en el tiempo, todos los esfuerzos emprendidos para realizar una monitorización de los niveles de medicamentos, contribuirán enormemente en la toma de decisiones clínicas y de estrategias de tratamiento, correlacionando niveles en suero o plasma y los niveles de anticuerpos como respuesta a las quimioterapias.

Por todo lo anterior, la técnica analítica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC), resulta ser fundamental para realizar una monitorización individual o simultánea de los niveles de los medicamentos en fluidos biológicos, empleados en el tratamiento de la TC, y permite poder



determinar los parámetros farmacocinéticos para evaluar la eficacia de los tratamientos (19, 21-24).

De igual forma, se genera conocimiento tecnológico local y nacional en la determinación, seguimiento y cuantificación de los fármacos medicados para el tratamiento de la TC, para hacer un seguimiento efectivo de los tratamientos y realizar los ajustes pertinentes, minimizando los efectos secundarios, para fortalecer la iniciativa de la implementación de un Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica contra la TC, que permita la monitorización terapéutica, debido a la alta prevalencia de los factores interindividuales.

Según el anterior planteamiento, la investigación se ha centrado en los siguientes objetivos:

### **General.**

Implementar un método de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC-DAD), para cuantificar las concentraciones sanguíneas de sulfadoxina (SDX) y sulfadiazina (SDZ) en niños con TC en el departamento del Quindío, bajo las condiciones locales.

### **Específicos.**

Implementar un método para la determinación de los niveles de SDX y SDZ por RP-HPLC-DAD frente a concentraciones conocidas de analitos, considerando los parámetros de selectividad, sensibilidad exactitud, precisión y linealidad.

Determinar la variación en suero sanguíneo de los niveles de medicamento SDX en  $\mu\text{g/ml}$  durante el tratamiento de niños con TC en muestras obtenidas durante el seguimiento terapéutico de niños en el primer año de vida.

Correlacionar los niveles del medicamento SDX, con los niveles de hemoglobina en  $\text{g/dL}$  y los niveles de IgG anti-*Toxoplasma* en  $\text{UI/mL}$  de suero de los niños con TC.



Para lograr los objetivos planteados, el trabajo de investigación se ha dividido en los siguientes capítulos:

## **CAPÍTULO 2: Incidencia de la toxoplasmosis en la salud.**

Los aspectos característicos de la parasitemia ocasionada por el *Toxoplasma gondii* y sus efectos en la salud, particularmente a nivel congénito, entre los que se destacan daños oculares, y cerebrales permanentes, son descritos en este capítulo. En los tratamientos establecidos para este tipo de antropozoonosis, se emplean una gama de antibióticos predominantemente de tipo sulfonamidas que se prescriben en combinación con otro tipo de antibióticos, por su efecto sinérgico, que inciden directamente en la salud de los pacientes. Las propiedades de estos fármacos, y en particular SDX y SDZ, los riesgos de su medicación en diferentes épocas de la gestación, su dosificación, su extracción, y posterior cuantificación, se describen también en el presente capítulo, considerando que su conocimiento básico y la terminología empleada, resultan apropiados para entender fácilmente los capítulos posteriores.

## **CAPÍTULO 3: Desarrollo del método cromatográfico RP-HPLC-DAD para la determinación de sulfonamidas en suero y plasma sanguíneo.**

En el siguiente capítulo se presentan las etapas tenidas en consideración en el desarrollo del método cromatográfico que permitieron en última instancia la cuantificación de los fármacos en muestras de suero sanguíneo de niños con TC, empleando la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa, acoplada a un Detector de Arreglo de Diodos (RP-HPLC-DAD). Para el desarrollo del método se seleccionaron los fármacos de interés, considerando las quimioterapias vigentes en el país para el tratamiento de la TC, y considerando que aun cuando la SDZ ha sido ampliamente usada en muchos países, en Colombia poco se comercializa, y es por lo cual, que la SDX se constituye como el medicamento llamado para el tratamiento. Seguidamente de la selección se procedió a realizar el ajuste de las condiciones instrumentales de inicio para lograr una adecuada separación entre los analitos y realizando



variaciones en las concentraciones de los fármacos se construyeron las respectivas curvas de calibración que permitirán realizar la cuantificación.

#### **CAPÍTULO 4: Verificación del método cromatográfico por RP-HPLC con Detector de Arreglo de Diodos (DAD) para la determinación de sulfonamidas en suero y plasma sanguíneo.**

En éste capítulo se describe el proceso de verificación del método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) acoplado a un Detector de Arreglo de Diodos (DAD), que incluye la determinación de los atributos de calidad como la linealidad, precisión, exactitud, selectividad, límite de detección y límite de cuantificación del método, considerando el tratamiento estadístico de los datos, así como los criterios de aceptación empleados.

Estos atributos permiten determinar el grado de seguridad que ofrece la metodología empleada a las condiciones descritas en el capítulo anterior, en cuanto a la obtención de resultados precisos y exactos a partir de las muestras de suero y plasma sanguíneos.

#### **CAPÍTULO 5: Evaluación de la presencia de fármacos en suero sanguíneo de niños con TC.**

El presente capítulo muestra los resultados obtenidos luego de la aplicación del método de cromatografía de Líquidos de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) acoplado a un Detector de Arreglo de Diodos (DAD), para la determinación de los antibióticos SDZ y SDX, que fue desarrollado y verificado previamente en la matriz de suero sanguíneo. Se describen los criterios y procedimientos que se consideraron para realizar la toma de las muestras en el Instituto de Biomédicas de la Universidad del Quindío, al igual, que el análisis de los resultados obtenidos. Dicha información permitió determinar los niveles de los fármacos de estudio en la matriz biológica, resultando posible su cuantificación para poder verificar los niveles de los mismos en la sangre de los niños bajo tratamiento médico, y poder establecer algunos elementos en la farmacocinética de los fármacos analizados (SDX y SDZ).



## **CAPÍTULO 6: Conclusiones y recomendaciones**

En este capítulo se registran las conclusiones más importantes del presente trabajo de investigación, y las recomendaciones para el desarrollo de futuros trabajos médicos.

## **CAPÍTULO 7: Bibliografía.**

Finalmente en este capítulo se reconocer la autoría de muchos conceptos, estudios, programas, entre otros empleados en el presente estudio, que no corresponden al autor.

## **ANEXOS:**

Se adjuntan documentos, que amplían el sustento de algunos resultados instrumentales, procedimientos realizados y análisis estadísticos efectuados.



## CAPÍTULO 2

### INCIDENCIA DE LA TOXOPLASMOSIS EN LA SALUD

---

*Los aspectos característicos de la parasitemia ocasionada por el *Toxoplasma gondii* y sus efectos en la salud, particularmente a nivel congénito, entre los que se destacan daños oculares, y cerebrales permanentes, son descritos en este capítulo. En los tratamientos establecidos para este tipo de antropozoonosis, se emplean una gama de antibióticos predominantemente de tipo sulfonamidas que se prescriben en combinación con otro tipo de antibióticos, por su efecto sinérgico, que inciden directamente en la salud de los pacientes. Las propiedades de estos fármacos, y en particular SDX y SDZ, los riesgos de su medicación en diferentes épocas de la gestación, su dosificación, su extracción, y posterior cuantificación, se describen también en el presente capítulo, considerando que su conocimiento básico y la terminología empleada, resultan apropiados para entender fácilmente los capítulos posteriores.*

---

## 2.1 INTRODUCCIÓN

El *Toxoplasma gondii* es un protozoo que produce patología por su obligado carácter parasitario intracelular (21,25-27); como todos los miembros del *phylum Apicomplexa* (13, 28), siendo el gato el hospedador definitivo, por ser capaz de soportar el ciclo sexuado del parásito, cuyo producto final es un cigoto, en los animales vertebrados y el hombre como hospedadores intermediarios, donde se presenta un ciclo asexual, que finaliza con la formación de quistes que se alojan en los tejidos (Figura1) (5, 24, 26, 29-31). El *T. gondii* puede producir una infección aguda en las personas sanas, (TC) e infecciones graves en pacientes inmunodeprimidos (5, 24, 28).

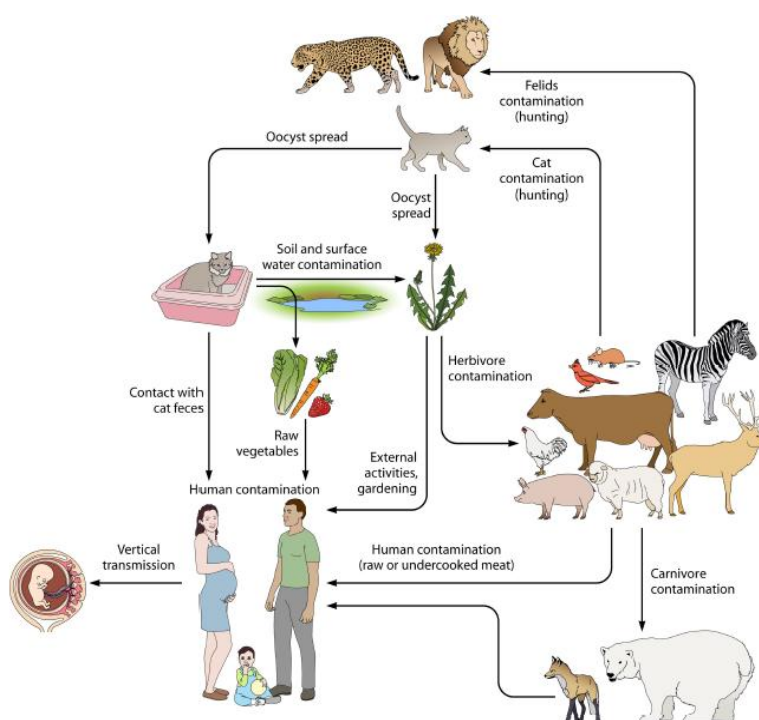


Figura 1. Fuente de la infección por *T. gondii* en los seres humanos.



## 2.2.2 Aspectos históricos

La infección por *T. gondii* es una zoonosis que se encuentra mundialmente distribuida y esto la distingue de otras parasitosis que afectan sobre todo a los países tropicales, siendo no endémicas en los países desarrollados. Sin embargo, hay variaciones en la prevalencia entre las diversas regiones geográficas del mundo (24).

Investigaciones han dado información acerca del origen del *Toxoplasma gondii*, donde se ha reportado que su origen fue posiblemente en Norte América, y que de allí migró hacia Europa y Sur América (32, 33), sin embargo, nuevos estudios proponen un modelo sobre la posible migración de cepas que guardan un monomorfismo cromosómico (Ia\*), datos que sugieren que el origen del haplotipo monomórfico se originó en América del Sur y se extendió a Norteamérica, (Figura 2). Igualmente se sugiere, que posiblemente los haplotipos Suramericanos 12, y la recombinación de los haplotipos 6 y 9, con el haplotipo 12, dieron origen a los linajes clonales modernos del parásito tipo II, I y III respectivamente, linajes dominantes hoy en día en Europa y América del Norte (33, 34).

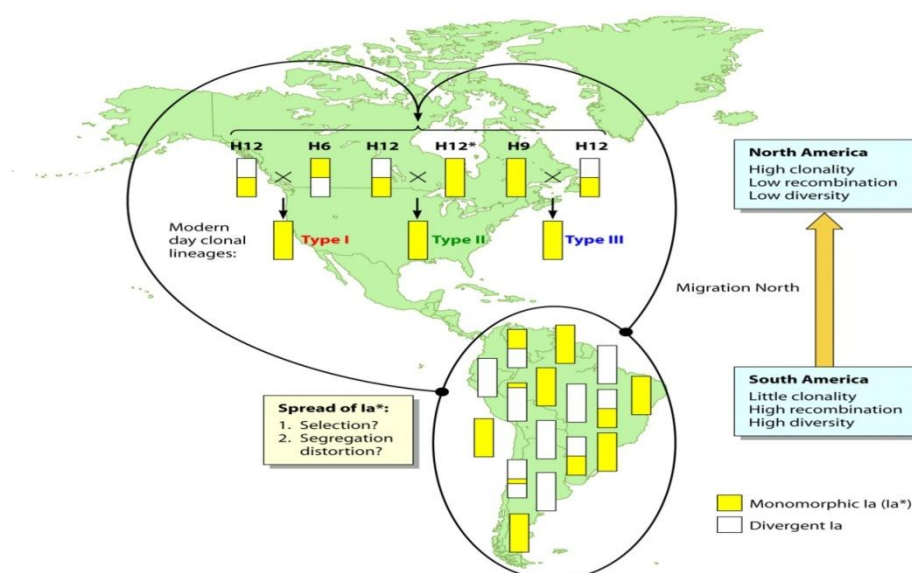


Figura 2. Origen cepas de *Toxoplasma gondii*.



2.2.2.1 Nosología de la infección: Hay serios indicios que el médico francés Laveran (1845 – 1922), quien realizó fundamentales estudios que lo llevaron al descubrimiento del parásito de la malaria (1880), quien más tarde ganara el premio Nobel (1907) (35), desempeñara un papel importante al describir las características morfológicas de un protozoo en aves, de lo que posiblemente se cree en la actualidad se trataba de un *Toxoplasma*. Diferentes autores convergen en afirmar que el *Toxoplasma gondii* fue descubierto y nombrado por Nicolle y Monceaux, en 1908, cuando aislaron en el hígado y el bazo de un roedor salvaje africano (*Ctenodactylus gondii*) un parásito intracelular. Al inicio creyeron que se trataba de una *Leishmania* pero un año más tarde le denominaron *Toxoplasma gondii* por su forma arqueada (del griego toxon: arcos) y por el nombre vulgar del roedor en que fue hallado, el *gondii*. En años posteriores fue identificado en numerosos vertebrados homeotermos (aves y mamíferos), y se designó con el nombre genérico de *Toxoplasma*, seguido del propio del animal donde se aislaba (ejemplo: *T. cuniculi*, *T. canis*, *T. avium*, entre otros) (36).

Reportes sugieren que las primeras descripciones de toxoplasmosis humana fueron realizadas por Castellani, en 1913; sin embargo realmente es visibilizada gracias al trabajo del oftalmólogo checo Janku, en 1923, cuando describió la presencia del toxoplasma en la retina de un niño que había fallecido con un cuadro de coriorretinitis acompañada de microftalmia (26, 36).

Son bastantes los trabajos y artículos que se han realizados con el objetivo de revelar características del *Toxoplasma gondii*, relacionados con el conocimiento de su ciclo biológico, las posibles pruebas diagnósticas y las medidas de control y prevención; ya que se trata de una zoonosis distribuida por todas las regiones del mundo (31, 36), y resulta importante destacar algunas referencias de la nosología toxoplásmica relacionadas en la revisión realizada por Pantoja y Pérez en 2001 (36):



1908: Se considera el año en que se produjo el descubrimiento del *Toxoplasma gondii*, en el *gondii*, roedor africano (Túnez). Nicolle y Manceaux realizaron una descripción muy completa de sus características morfológicas.

1908: Splendore (italiano), en un laboratorio de Sao Paulo, Brasil, identificó al protista en el cerebro de un conejo y lo consideró una variedad especial del género *Leishmania*.

1909: Carini demostró la reproducción experimental del *T. gondii* en conejos. Mello reportó el primer caso de toxoplasmosis canina, descubierto en Turín (Italia), en un perro aparentemente infectado de moquillo. Observó anemia pronunciada, anorexia, debilidad extrema, diarrea y exudado sanguinolento.

1910: Prowazec repitió satisfactoriamente el experimento efectuado por Carini, en 1909.

1911: Yakinoff reportó el caso de un niño con toxoplasmosis, aunque no describió el toxoplasma con su nombre.

1911: Carini reportó la infección en perros. 1913: Catellani describió, por primera vez, la toxoplasmosis en humanos.

1913-1916: Carini y Maciel identificaron el toxoplasma en perros, palomas y cobayos, además lograron las primeras cepas recíprocas entre mamíferos y aves.

1913-1918: Mesnil y Sarrailhé retomaron, confirmaron y ampliaron la observación de Carini y Maciel; establecieron, por primera vez, las pruebas de inmunidad cruzada (1918).

1916: Fedorovich reportó un caso en un canino y otro en un niño del mismo vecindario, y se encontró el microorganismo circulante y cuadro febril en ambos casos. Por primera vez se relacionan la toxoplasmosis canina y la humana.

1916-1918: Chatton y Blanc realizaron trabajos sobre inespecificidad del *T. gondii* y pruebas de inmunidad cruzada.



1923: Janku (checo) describió la coriorretinitis en un paciente afectado de meningoencefalitis aguda. Se detectó la presencia de *Toxoplasma* en la retina.

1928: Levaditi relacionó la toxoplasmosis con la hidrocefalia.

1929: Lépine, Weiman, Jacobs, Ruchman y otros destacaron la persistencia de quistes en tejidos por meses y años. Explicaron las formas asintomáticas y crónicas. Relacionaron el toxoplasma con el embarazo.

1933: Levaditi y Schoën detectaron el *T. gondii* en un mono (babuíno), mediante el control de laboratorio.

1935: Sabin y Olitsky demostraron el parasitismo obligado del *T. gondii*. Realizaron cultivos en tejidos y pruebas serológicas. Ratificaron su inespecificidad y confirmaron su ubicuidad.

1937: Sabin y Olitsky inocularon el toxoplasma en animales de laboratorio. Descubrieron los anticuerpos protectores.

1937: Wolf y Cowen estudiaron el caso de una niña con coriorretinitis y encefalomiелitis granulomatosa por parásitos.

1937: Nicolau y Ravelo descubrieron los anticuerpos fijadores del complemento.

1938: Kopciowska y Nicolau identificaron el toxoplasma en chimpancés (control de laboratorio).

1939: Wolf y Cowen lograron la transmisión experimental.

1939: Wolf, Cowen y Paige aislaron el microorganismo en lactantes con encefalomiелitis congénita.

1941: Pinkerton y otros describieron la toxoplasmosis humana adquirida.

1942: Olafson y Monlux describieron por primera vez la toxoplasmosis en los gatos (EE.UU.), y se refirieron a la transmisión por consumo de carne mal cocida.



1942: Guimaraes y Meyer estudiaron la motilidad y describieron un pseudoflagelo o "trombícula", hecho importante para la nomenclatura y la biología.

1942: Springer y Johnson (Keagy y Wiktor, 1952) describieron epizootias extensas en cerdos, conejos, palomas y otros animales. Explicaron la importancia epidemiológica (contagio humano). 1945: Callahn describió la toxoplasmosis hepática.

1945 y 1950: Manwell, Van Thiel y Cowen se refirieron a la infestación por consumo de carne cruda.

1948: Sabin y Feldman propusieron y utilizaron la prueba de diagnóstico conocida como *Dye-Test*.

1948: Frenkel propuso la prueba de la toxoplasminao PID.

1949: Van Thiel destacó la transmisión por vía genital (machos) y por gotas aéreas.

1950: Wickham y Carne reportaron la toxoplasmosis en Australia. 1951: Slim, Gardi y Magnuson reportaron la linfadenitis toxoplásmica.

1952: Farrel se refirió a la infestación porcina y a la transmisión por consumo de carne mal cocida.

1952: Bamatter describió la TC.

1952-1955: Jacobs, Melton, Nobrega, Erichsen y otros se refirieron a la infestación aviar (gallinas, patos y pavos).

1953: Sanger reportó la infectación bovina y la transmisión por la leche.

1954: Guftason describió el conoide. 1954: Westphal describió el filopodium.

1954: Flir (Alemania) describió la gastritis aguda en un perro con toxoplasmosis.



1955: Yamamoto, Ishida y Fujiwara se refirieron a la toxoplasmosis en gatos (Asia).

1956: Groula de destacó a los gatos como reservorio doméstico. En el mismo año: Leinson (Inglaterra) describió el hallazgo del toxoplasma en un perro.

1957: Braunsteiner describió los toxonemas.

1957: Meir se refirió al reservorio en perros, gatos, ratones y ratas. 1957: Golman y Kellen aplicaron la prueba de inmunofluorescencia indirecta. 1957: Gibson y Eyles realizaron investigaciones serológicas.

1957: Jones, Eyles y Gibson describieron el cuadro clínico y anatomopatológico.

1957: Meir, Holzworth y Griffiths contribuyeron al conocimiento de la toxoplasmosis en los gatos.

1958: Saint y Martín destacaron el reservorio en perros, gatos, ratones y ratas.

1959: Eyles, Gibson, Coleman y otros realizaron estudios clínicos y anatomopatológicos de la toxoplasmosis en gatos.

1960: Cowen, Wolf, Labady y Werner estudiaron la infección por vía genital en las hembras (contagio venéreo).

1960: Gibson y Jumper realizaron estudios en perros con la utilización del método de diagnóstico *Dye-Test*.

1960: Crome destacó las secuelas neurológicas y el retardo mental.

1963: Siim, Biering Sorensen y Moller refieren que la toxoplasmosis espontánea ha sido reportada en 27 tipos diferentes de mamíferos salvajes y domésticos.

1963: Francois reportó la embriopatía toxoplásmica de tipo mal formativo.

1963: Langer observó la presencia de quistes en el útero.



1965: Marcato reportó hallazgos patomorfológicos de la toxoplasmosis en perros, en Italia.

1965: Hutchison y otros describieron el ciclo biológico y el ciclo de transmisión.

1970: Sheffield y Melton realizaron estudios sobre la forma fecal de la toxoplasmosis en gatos.

1970: González y Martín señalaron las observaciones clínicas y anatomopatológicas de un caso de toxoplasmosis canina en Valdivia, Chile.

1970: Aluja realizó un estudio histológico de la toxoplasmosis canina en México.

1971: Frenkel realizó estudios sobre el ciclo del toxoplasma en la naturaleza y demostró la forma en que se efectúa en el gato.

1971: Averill y de la Hunta reportaron 3 casos positivos de toxoplasmosis canina con síntomas nerviosos, en EE.UU.

1971: Weiland, Kuhn y Saar investigaron las secreciones y excreciones de perros infectados por quistes toxoplásmicos.

1972: Prakash señaló que los resultados de la prueba del complemento son de gran utilidad para diferenciar el estado agudo del crónico, en la toxoplasmosis.

1974: Anderson y Remington demostraron el papel de los macrófagos.

1975: Bout y Voller propusieron el método de ELISA.

1975: Donev en estudios realizados en individuos, aparentemente sanos, detectó cifras elevadas de anticuerpos para el toxoplasma.

1979: Chhabra y Mahajan realizaron un estudio para calcular el predominio de anticuerpos de toxoplasma en el ganado cebú, en el norte de la India.

1981: Chhabra, Bhardwaj, Gautam y Gupta realizaron investigaciones serológicas de toxoplasmosis mediante la prueba de hemoaglutinación indirecta



en un rebaño de cabras lecheras, y se consideró a *T. gondii* como causa importante de abortos y de mortalidad perinatal en ovinos en Australia, Nueva Zelandia y Gran Bretaña.

1983: Lung se refirió a la toxoplasmosis en el sistema nervioso central.

1985: Brady, Brederso y Rosenblum estudiaron la neurotoxoplasmosis en pacientes con SIDA.

1985: Hughes y Van Knap se refirieron a los antígenos de excreción y secreción.

1989: Johnson y otros utilizaron marcadores genéticos para el diagnóstico.

1989: Burgs y otros utilizaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico.

1997: Bowie, King, Werker, Issac-Renton, Bell, Eng y otros realizaron un estudio sobre la probable contaminación del agua de consumo por toxoplasma.

### **2.2.3 Epidemiología**

El protozoo apicomplexa *Toxoplasma gondii* es una zoonosis oportunista que infecta a una gran proporción de poblaciones humanas del mundo, sin embargo, no es una causa frecuente de enfermedad. Los fetos, los recién nacidos con infección congénita y las personas con deterioro inmunológico son individuos con alto riesgo de enfermedad grave o potencialmente fatal debido a este parásito (5, 37, 38) El *Toxoplasma gondii*, es un parásito intracelular obligado, capaz de afectar las células de todos los tejidos de los vertebrados, siendo los eritrocitos las únicas células no parasitadas (38). El esquema de la figura 3, se da un enfoque general de la toxoplasmosis (39).



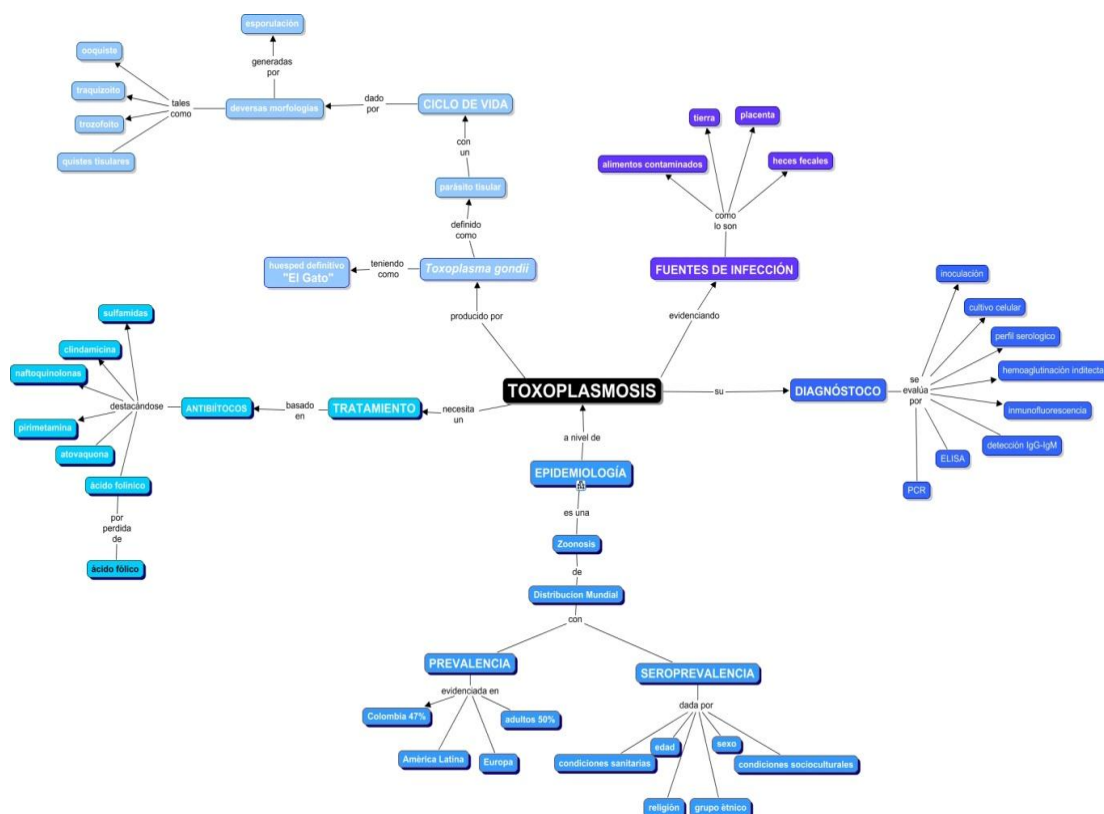


Figura 3. Esquema epidemiológico de la Toxoplasmosis.

Actualmente, se presenta una nueva taxonomía, eucariota, (figura 4) (10), basada en una división de seis supergrupos, y dos rangos diferentes, dentro de los cuales, se observa que los protozoos de importancia médica pertenecen a los súper grupos Amebozoa, Chromoalveolata y Excavata, y llamativamente, los protozoos patógenos humanos pertenecen mayoritariamente al primer rango Alveolata (14)

Table 1. Highest ranks of the eukaryotes with the next two ranks as presented in Table 2.

Super-groups	First rank	Second rank, examples
Amoebozoa	Tubulinea	Leptomyxida, Testacealobosia, Tubulinida
	Flabellinea	<i>Cochliopodium</i> , Dactylopodia, Thecamoebida, Vanellida
	Stereomyxida	
	Acanthamoebidae	
	Entamoebida	
	Mastigamoebidae	
Opisthokonta	<i>Pelomyxa</i>	
	Eumycetozoa	Dictyostelia, Myxogastria, Protostelia
	Fungi	Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycetes, Glomeromycota, Microsporidia, Urediniomycetes, Ustilaginomycetes, Zygomycota
	Mesomycetozoa	Aphelidea, <i>Capsaspora</i> , <i>Corallochytrium</i> , Ichthyosporea, <i>Ministeria</i> , Nucleariida
Rhizaria	Choanomonada	Acanthoecidae, Monosigidae, Salpingoecidae
	Metazoa*	Porifera, <i>Trichoplax</i> , Mesozoa, Animalia
	Cercozoa	Cercomonadida, Chlorarachniophyta, Nucleohelea, Phaeodarea, Phytomyxea, Silicofilosea
	Haplosporidia	
Archaeplastida	Foraminifera	Subdivisions uncertain
	<i>Gromia</i>	
	Radiolaria	Acantharia, Polycystinea, <i>Sticholonche</i>
	Glaucophyta	
Chromalveolata	Rhodophyceae	Subdivisions uncertain
	Chloroplastida	Charophyta*, Chlorodendrales, Chlorophyta, <i>Mesostigma</i> , Prasinophytaceae
	Cryptophyceae	Cryptomonadales, Goniomonadales
	Haptophyta	Pavlovophyceae, Prymnesiophyceae
Excavata	Stramenopiles	Actinophryidae, Bacillariophyta, <i>Bolidomonas</i> , Bicosoecida, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatales, Hypochytriales, Labyrinthulomycetes, Opalinata, Pelagophyceae, Peronosporomycetes, Phaeophyceae*, Phaeothamniophyceae, Pinguiochrysidales, Raphidiophyceae, <i>Schizocladia</i> , Synurales, Xanthophyceae
	Alveolata	Apicomplexa, Ciliophora, Dinozoa
	Fornicata	<i>Carpediemonas</i> , Eopharyngia
	<i>Malawimonas</i>	
Excavata	Parabasalia	Cristamonadida, Spirotrichonymphida, Trichomonadida, Trichonymphida
	Preaxostyla	Oxymonadida, <i>Trimastix</i>
	Jakobida	Histonidae, <i>Jakoba</i>
	Heterolobosea	Acrasidae, Gruberellidae, Vahlkampfiidae
	Euglenozoa	Euglenida, Diplonemea, Kinetoplastea

\*Clades with multicellular groups.

#### Figura 4. Nueva clasificación de Eucariotas.

La infección en seres humanos ocurre sobre todo a través de la ingestión de carne cruda o mal cocida que contiene quistes, a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados con ooquistes o de manera congénita a través de la transmisión transplacentaria (28, 40, 41).

Las condiciones ambientales tienen incidencia en el desarrollo de los ooquistes; y en particular los climas muy fríos o muy calientes o secos son adversos para el parásito (24).



La transmisión en la lactancia o transmisión directa de humano a humano no se ha descrito, excepto la que ocurre de la madre al feto en el curso de la infección aguda durante el embarazo.

La infección materna antes del embarazo no supone riesgo para el feto; sin embargo, se han descrito excepcionalmente transmisiones en mujeres que se infectaron por lo menos dentro de 3 meses antes de la concepción (24).

La gran mayoría de pacientes adquieren la infección sin darse cuenta, sin poderse establecer por lo general la vía específica de transmisión (24). Las variaciones en la seroprevalencia de *T. gondii* entre regiones se ha correlacionado con los hábitos de higiene y alimentarios de cada población, las cuales se ubican en zonas de menor salubridad y más pobladas. Se encuentra suficiente soporte para pensar que la vía oral es la más importante para el comienzo de la infección (41).

La toxoplasmosis constituye una importante causa de morbilidad y de mortalidad neonatal, reportándose a nivel mundial entre 1:10000 y 1:1000 de nacidos vivos, ocasionando principalmente lesiones oculares y alteraciones cerebrales graves del sistema nervioso central, que se acentúan en pacientes con inmunodeficiencias severas como aquellos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (41).

#### **2.2.4 Agente etiológico**

Para efectos de claridad y ubicación biológica, se establece la clasificación taxonómica tradicional, aceptada todavía en muchos ámbitos científicos, del protozoo (esporozoo), *T. gondii* que se relaciona seguidamente: Reino Protista, Subreino Protozoo, Phylum Apicomplexa, Clase Coccidia, Familia Sarcocystidae, Género *Toxoplasma*, Especie *Toxoplasma gondii* (42), y en la nueva clasificación posiblemente esté dentro del súper grupo Chromalveolata, el primer rango alveolata, y el segundo rango, apicomplexa (14).

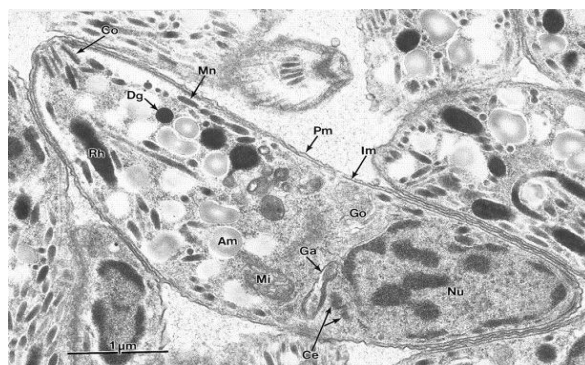
El parásito adopta diferentes estados según la fase de su desarrollo. Su nombre se deriva de la palabra griega “toxón”, que significa arco, por su morfología curva o de medialuna. Se caracterizan por tener un complejo apical que les permite perforar los tejidos (conoide). La forma infectante es el ooquiste que sale en las materias fecales, es casi esférico y mide de 10 a 12 micras, en su interior se forman los esporoquistes y en cada uno de ellos hay 4 esporozoitos. En la infección aguda se encuentra la forma proliferativa o taquizoito, término que se refiere a los parásitos extraepiteliales que se multiplican rápidamente. Su tamaño es de 4-6 micras de longitud, por 2 a 3 de ancho. En las infecciones crónicas los quistes son las formas predominantes. Los quistes poseen una membrana propia y miden entre 20 y 200 micras, de forma generalmente redondeada, algunas veces alargada. En su interior, se encuentran cientos de parásitos conocidos como bradizoitos, término que señala los elementos extra epiteliales que se forman por multiplicación lenta. Estos parásitos intraquísticos miden aproximadamente 7 micras de longitud por 2 de ancho. Éstos aparecen en el ciclo de vida del parásito, inducidos por el estado inmunitario del huésped (41). En la figura 5, se muestran las formas infectivas del *Toxoplasma* (43)



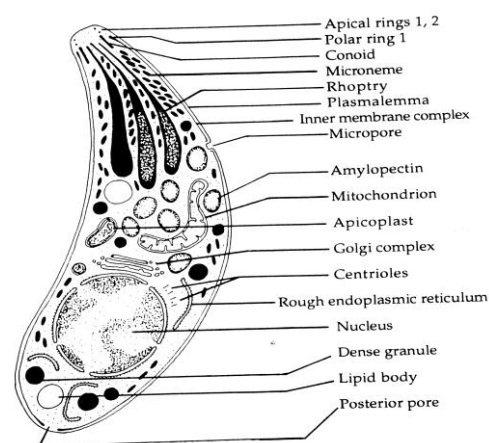
Figura 5. Formas parasitarias del *Toxoplasma gondii*, taquizoito (izquierda), quiste con bradizoitos (centro), y ooquistes (derecha).

2.2.4.1 Ciclo biológico del *Toxoplasma gondii*: El ciclo se divide en dos partes: un ciclo sexual que ocurre por gametogonia en las células epiteliales del intestino delgado del gato (hospedero definitivo) y de algunos otros félidos; y un ciclo asexual que ocurre en los tejidos extra-intestinales de los félidos y de otros

huéspedes, de sangre caliente tales como: ganado vacuno, ovino, porcino, entre otros, incluido el hombre (hospederos intermediarios) (10, 42, 44). En el siguiente esquema (Figura 6) (45) se indican las partes principales de la célula parasitaria.



Bradizoito en el quiste tejido se muestra en la figura. 13. Am, gránulo amiloplectina, Ce, centriolos; Co, conoide, Dg, gránulos electrón-densos, Ga, Golgi adjunto (apicoplast), Go, complejo de Golgi, Im, complejo de la membrana interna, Mi, mitocondria, Mn, microneme; Nu núcleo; pm, plasmalema, Rh, rhoptry.



Dibujo esquemático de un esporozoito de *T. gondii*.

### Figura 6 Componentes celulares del *Toxoplasma gondii*.

La replicación sexual se produce sólo en el intestino del gato, lo que resulta en la liberación al medio ambiente de (a) ooquistes diploides inmaduros no infectivos (un gato es capaz de expulsar alrededor de 10 millones de ooquistes diariamente, donde cada ooquiste está compuesto por ocho esporozoitos, verdadera forma parasitaria infectante (10, 42), con diámetro aproximado entre 8 a 10 µm de diámetro, en forma de esporogonio, que contiene hasta 8 esporozoitos de gran resistencia. Este se refiere a las etapas de desarrollo dentro de los enterocitos, lugar donde ocurre una diferenciación en un macrogameto (célula femenina), y un microgameto (célula masculina), luego de la producción de un cigoto, por la fecundación del macrogameto, este se convierte en un ooquiste inmaduro no infectante pero muy resistente al medio ambiente. Luego de unas divisiones el ooquiste madura y se convierte en infectante lo que da lugar a infecciones para una gran variedad de huéspedes intermedios. Durante la infección aguda, donde proliferan rápidamente (b)

taquizoitos, al difundirse dentro del huésped, por reproducción intracelular (46), procesoen el que las células hijas se forman internamente dentro de la célula madre (endodiogenia) (47), donde luego, el hospedero desarrolla inmunidad, la infección se hace crónica y se forman los verdaderos quistes tisulares con los (c) bradizoítos (forma de proliferación lenta) forma menos susceptible a quimioterapia, que dan lugar a la infección a largo plazo y se transmiten asexualmente después de la ingestión oral de una variedad de huéspedes, incluido el hombre al ingerir carnes mal cocidas o semicrudas de animales infectados(10, 42, 44, 46).

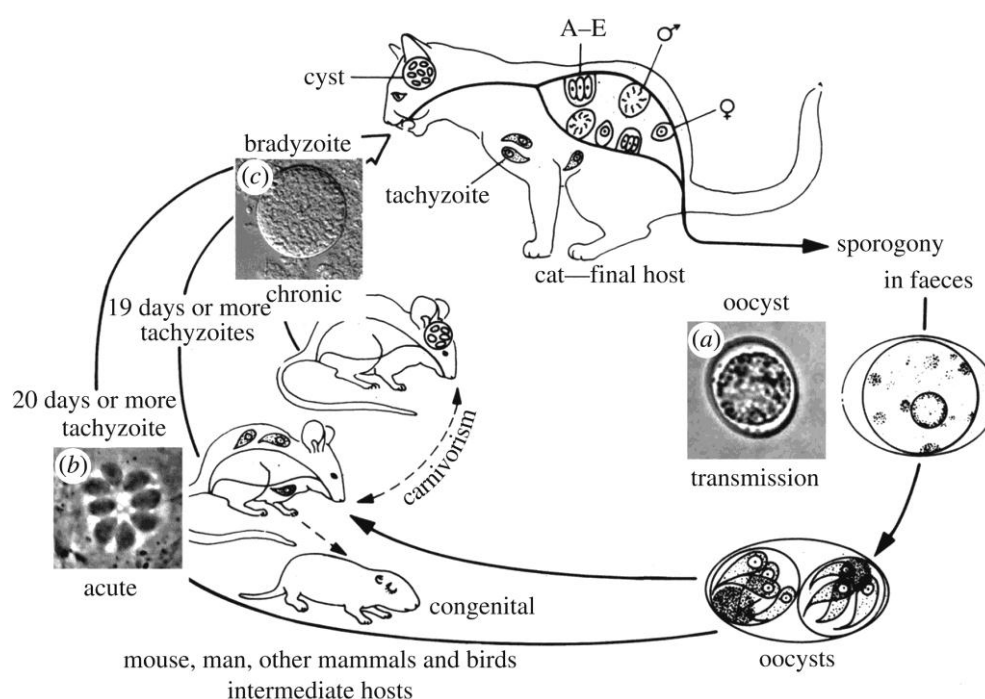


Figura 7. Ciclo biológico del *Toxoplasma gondii*.

El *Toxoplasma gondii*, presenta tres tipos de linajes genéticos que determinan la virulencia demostrándose en modelos animales (ratones) los genotipos: I, II y III; esta no es aún una herramienta diagnóstica en humanos infectados, pero puede estar asociado alguno de estos tipos con lesiones de mayor severidad. Un estudio mostró en pacientes con TC, al usar marcadores de microsatélite y marcadores isoenzimáticos, que la virulencia tipo II (mayormente encontrado en Norteamérica y Europa) predominó con un 84,88 % (86 pacientes) y que el tipo I (predomina en Suramérica), presenta altas tasas de virulencia y reproducción, y





difíciles de aislar (48). En pacientes con SIDA el tipo mayormente aislado es el II; el tipo I y II se ha podido aislar en pacientes con enfermedad congénita; en animales el genotipo mayormente aislado es el III recombinación entre el tipo I y II (48).

### **2.2.5 Toxoplasmosis y el embarazo**

La TC se transmite por vía transplacentaria y la condición necesaria es que la madre sufra durante el embarazo una diseminación hematológica. Ello ocurre cuando la madre adquiere una *primoinfección* durante el embarazo y, mucho más raramente, si como consecuencia de una inmunodepresión coincidente con el embarazo se reactiva una toxoplasmosis latente. La probabilidad de una primoinfección durante el embarazo es de 0,5-1%, con independencia del área geográfica. La probabilidad global de transmisión maternofetal es del 50%, aunque parece ser considerablemente inferior durante el primer trimestre y superior durante el último, y puede reducirse al 5% o menos si la infección de la madre se detecta y se administra el tratamiento adecuado. La incidencia global de infección por toxoplasma es de 1-3 por cada 1.000 nacidos vivos (49).

En Colombia, El primer estudio nacional sobre toxoplasmosis adquirida durante el embarazo tuvo lugar en 1976 en Medellín con una muestra de 120 gestantes mediante la prueba del colorante (dye test), donde se encontró una tasa de seroconversión (paso de seronegativas a seropositivas), inusualmente alta si se compara con otros estudios a nivel mundial. Luego, en 1988 los mismos investigadores con la inmunofluorescencia indirecta para IgG (IFI-IgG) encontraron una tasa de 1.7% (IC95%: 0.9-2.5) en 960 madres; aunque en el trabajo no se indicó el criterio utilizado, los autores consideraron que la primera tasa hallada se debió a un brote epidémico en el momento de realizar el estudio. Se podría asumir entonces, que por lo menos de 2 a 10 por cada 1,000 nacidos vivos en Colombia tendrían TC. Con el estimativo que cada año se presentan 300,000 nuevos nacimientos en el país, entonces entre 600 y 3,000 niños nacerían con la infección congénita (26), la mayor parte totalmente asintomáticos



(450 a 2,250), mientras sólo 150 a 750 presentarían las manifestaciones características en los primeros meses de vida (20, 26, 50).

- Riesgo de la infección durante el embarazo. El riesgo de la infección por *T. gondii* durante el embarazo en una población determinada depende de:

1. La circulación del parásito en el medio y la comunidad. Esto se puede reflejar en los cambios de la prevalencia de la infección por *Toxoplasma gondii* en la población general en el curso de los años.

2. El riesgo que tienen la mujeres susceptibles de adquirirla infección en el curso del embarazo (*incidencia de infección durante el embarazo*) (26).

- Prevalencia de la infección pasada. “La prevalencia de la infección por *T. gondii* difiere en las zonas geográficas del mundo. En varios países industrializados comenzó a comprobarse la disminución de la prevalencia al mejorar las condiciones de vida y reducir la infección de *T. Gondii* en animales de consumo humano. En las zonas donde existe mayor transmisión, la prevalencia de transmisión congénita es mayor, y por tanto la seroprevalencia se incrementa desde edades más tempranas” (26).

Este comportamiento depende de varios factores, la zona geográfica y costumbres de las comunidades. Por ejemplo, la tasa de seroprevalencia en embarazadas en Francia es cerca del 54%, mientras en Suecia era tan solo de 12%, en estudios más recientes se reportan datos para Colombia y Estados Unidos con tasas del 15% para mujeres entre los 15 y 44 años, lo cual en comparación con estudios anteriores la tasa de seroprevalencia no ha cambiado, significativamente, al mismo tiempo, que para Colombia una seroprevalencia entre el 47% y el 60% (20), que en contraste con el Estudio Nacional de Salud realizado entre 1977 y 1980, que mostro una tasa de seroprevalencia en mujeres en edad fértil entre el 42.5% y 54.4%, con una desigual distribución nacional; se evidencia una situación complicada en lo referente a los avances en la disminución de la seroprevalencia en los últimos 25 años (20, 26).





- Riesgo de transmisión vertical de la madre al feto. El riesgo de la TC, en los neonatos se relaciona directamente con tres factores:

- 1) La incidencia de la infección aguda en las mujeres durante el embarazo.
- 2) La edad gestacional en la que la mujer embarazada adquirió la infección.
- 3) Los programas de salud pública instituidos para prevenir, diagnosticar y tratar la infección durante el embarazo.

La prevalencia mundial de la TC en recién nacidos puede variar de 1 a 10 por 10,000 nacidos vivos (NV), sin embargo varía según el área geográfica: Suecia: 1/10,000 NV, Brasil: 3/10,000 NV, Francia: 10/10,000 NV (26).

- Riesgo de secuelas clínicas en el niño infectado congénitamente. El riesgo de transmisión materno-fetal y el riesgo de secuelas en el feto se relacionan de modo inverso, con la edad del embarazo. Las infecciones tempranas de la madre en la primera mitad, tienen menor riesgo de transmisión materno-fetal, pero si se contamina el feto, podrá resultar en infección congénita severa, muerte fetal in útero o aborto espontáneo. Por el contrario, en las infecciones maternas tardías en el embarazo, si el feto se infecta, por lo general resulta en neonatos que parecen normales. La frecuencia de infección subclínica en neonatos puede ser tan alta como 85% (26).

El laboratorio de Biomédicas de la Universidad del Quindío, ha documentado varios casos que se han presentado en diversos centros asistenciales del Quindío (Figuras 8-14), donde se evidencia claramente las lesiones que ocasiona la TC, a los niños, y más aún, sin tratamiento oportuno (51), y se muestra las lesiones producidas a nivel ocular (52).

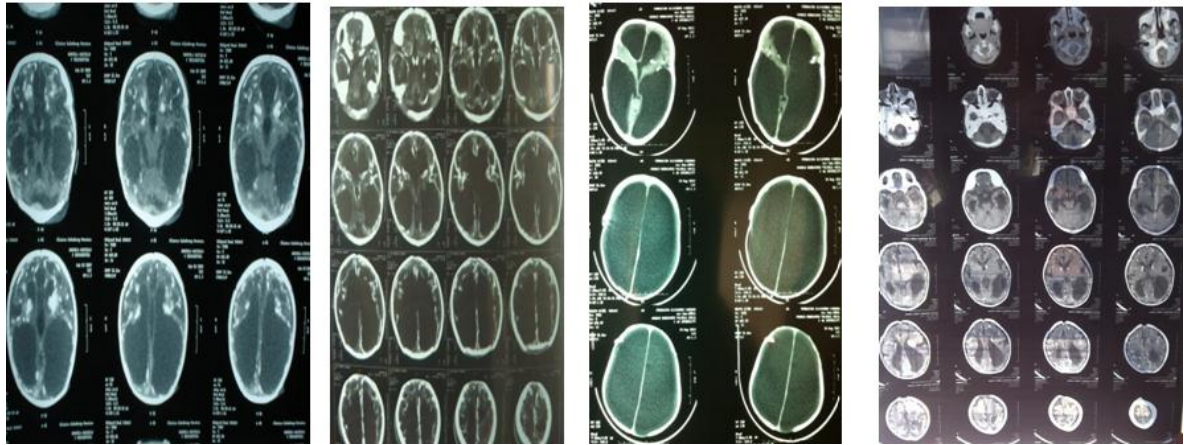


Figura 8. Tomografía cerebral de niños con TC, sin tratamiento prenatal.

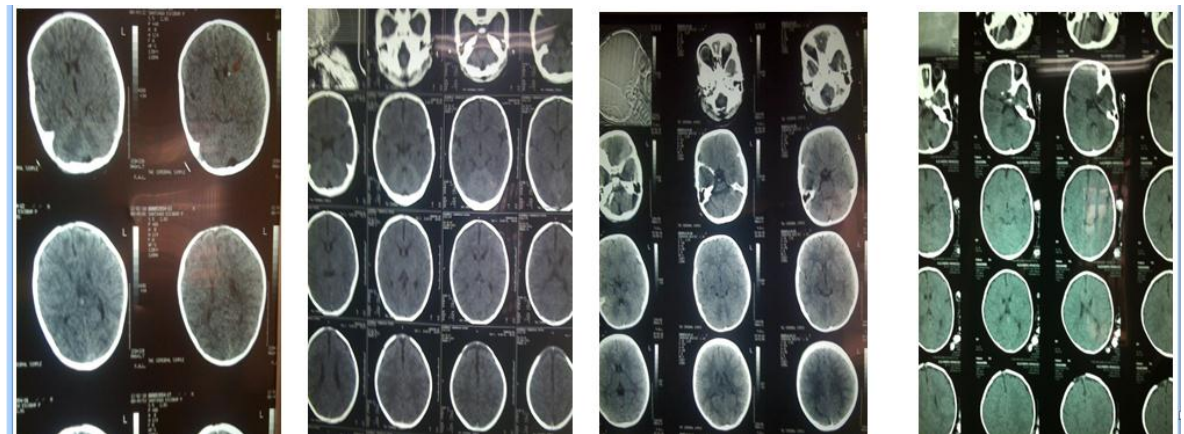


Figura 9. Tomografía cerebral de niños con TC, con tratamiento prenatal.

En el año 2009 (Figura 10), se atendió paciente que presentaba el siguiente cuadro clínico, donde se aprecian las lesiones:

Madre IgG anti-Toxoplasma Negativo en el segundo mes de gestación, 5 controles prenatales y 2 ecografías, la última de las cuales se realiza en el tercer trimestre del embarazo y es reportada como normal (ecografía de segundo nivel). IgM anti-CMV negativa, IgG anti-Toxoplasma positiva (>300 UI/ml) por MEIA e IgM anti-Toxoplasma positiva (1.066).

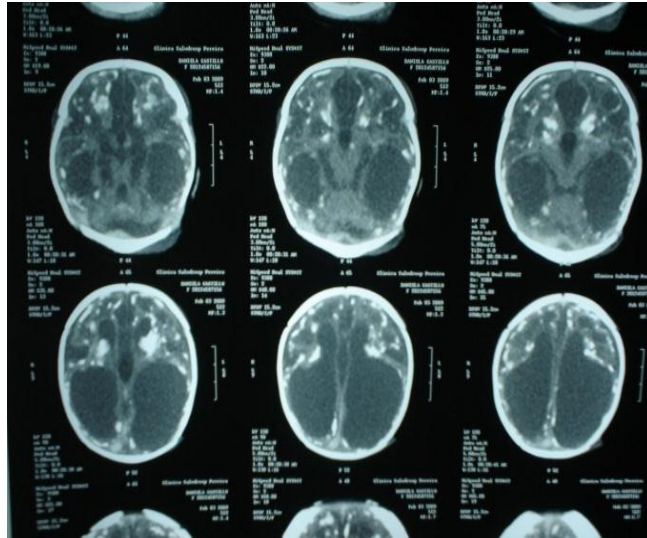


Figura 10. Primer caso de hidranencefalia 2009 – Armenia HUSJD.



Figura 11. Niño con TC. Foto tomada por enfermera de turno en URN (24/07/12), Servicio de Urgencias Hospital Universitario San Juan de Dios, Armenia – Quindío.



Figura 12. Radiografía de tórax (Hepatomegalia).



Figura 13. Ecografía abdominal. (Hepatomegalia moderada).

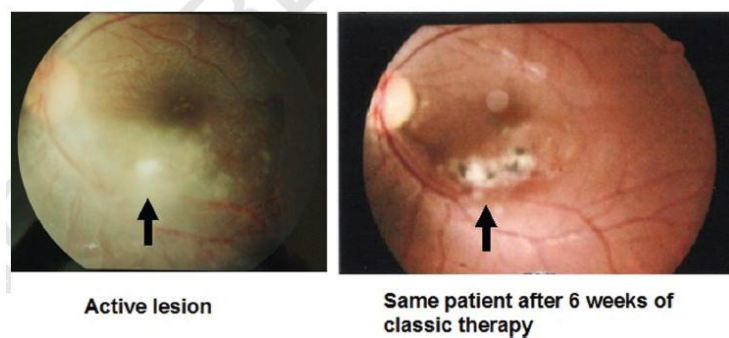


Figura 14. Daño ocular fetal por TC.

En estudio realizado en 2003, se hace un consolidado de los principales efectos congénitos, ocasionados por el *Toxoplasma gondii*, según el trimestre de



ocurrencia de la infección, y la severidad de los mismos, la cual, probablemente obedezca a una relación inversamente proporcional entre ambas variables (53).

Tabla 1. Consecuencias fetales por TC, según trimestre de gestación.

PRIMER TRIMESTRE	SEGUNDO Y TERCER TRIMESTRE
Aborto espontáneo - 90%	Retinocoroiditis - 85 a 90%
Signos de infección severa (10%), principalmente la triada clásica (Calcificaciones intracerebrales, hidrocefalia, retinocoroiditis); también retardo mental severo y/o ceguera, miocarditis, microoftalmia, mortinatos, etc.	La triada clásica es muy escasa en este periodo.
	Calcificaciones intracerebrales.
	Mastoiditis e infección del oído interno (generan hipoacusia o sordera)
	Retardo mental leve a moderado (raras veces severo)
	Infección de septos alveolares, septum interventricular y ventrículo derecho cardíaco; glomerulonefritis focal, restricción del crecimiento intrauterino.

Roso *et. al*, en 2007 (26)., muestra un resumen importante (Figura. 15.), acerca de las consecuencias de la infección por *T. gondii*, en gestantes inmunocompetentes, dependiendo del trimestre de ocurrencia de la infección, que se detalla a continuación:

Semanas de gestación a la seroconversión materna	Riesgo de infección congénita <sup>a</sup> (%)	Riesgo de desarrollar signos clínicos dada la infección congénita <sup>b</sup> (%)	Riesgo de desarrollar signos clínicos dada la infección materna <sup>c</sup>
Seis meses antes de la concepción	Virtualmente 0 <sup>d</sup>	>80	Muy bajo riesgo (Muy bajo riesgo de transmisión)
Concepción a la semana 10	2	70-80	Bajo riesgo (bajo riesgo de transmisión)
Semanas 10 a 24	30	30	Alto riesgo (se incrementan la transmisión y los signos clínicos)
Semana 30 al parto	60-80	15-5	Bajo riesgo (infección congénita es frecuente pero usualmente subclínica)

a. Riesgo de infección congénita (transmisión materno-fetal)

b. Riesgo de desarrollar signos clínicos pues ocurrió la infección congénita (no necesariamente sintomáticas antes de los tres años de edad)

c. Riesgo de de secuela de la infección materna, sin conocer la infección congénita (no necesariamente sintomáticas antes de los tres años de edad)

d. Se han descrito casos de transmisión fetal aun tres meses antes de la primoinfección.

Los porcentajes se dan como un rango de acuerdo con lo observado en mujeres, cuya mayoría se trató con espiramicina durante el embarazo. Es importante enfatizar que estas probabilidades se basan en mujeres embarazadas no inmunocomprometidas.

Figura 15. Conceptos de riesgo de transmisión y secuelas para el niño con TC.

Una revisión efectuada por Díaz *et al*, en 2010 (54), determino que la frecuencia de transmisión del *T. gondii* y la severidad de la enfermedad para el feto o recién

nacido, están inversamente relacionadas, (Figura 16); es decir, que a mayor edad gestacional, mayor será la posibilidad de transmisión al feto, pero menor será la severidad de la toxoplasmosis en este producto de la concepción. Igualmente reporta que el riesgo de infección fetal por trimestre es de 25 % en el 1er trimestre, 54 % en segundo trimestre y tercer trimestre 65 %, en cambio el riesgo de severidad de la enfermedad es de 75 % en primer trimestre, y de 17 % y 0 % para segundo y tercer trimestre respectivamente. Similares resultados fueron reportados por Rosso, *et al*, 2007 (26).

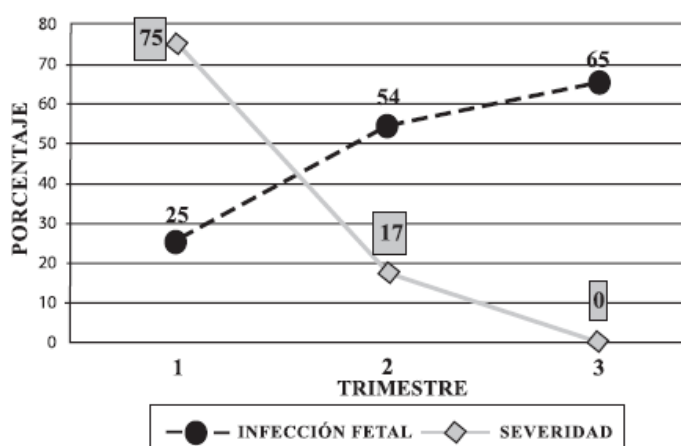


Figura 16. Relación infección fetal - severidad.

Estudios recientes visibilizan la importancia del conocimiento de los factores de riesgo, ya que permitirán tomar las acciones pertinentes, hacer recomendaciones para la realización de programas de educación y de prevención. Igualmente establecen tres categorías para los factores de riesgo bien diferenciadas:

- Factores riesgo Sociodemográficos. Comprende aspectos como: la edad, donde se reporta que la prevalencia de la toxoplasmosis se incrementa con la edad. La raza, aunque se explica las diferencias en la prevalencia entre poblaciones nativas e inmigrantes, debido probablemente más a factores epidemiológicos y geográficos de infección, más que por diferencias étnicas o genéticas del hospedero. Área de residencia, al parecer hay serios indicios que la prevalencia de la toxoplasmosis tiene



una alta correlación con los niveles de precipitación según las zonas geográficas, como lo que ocurre en la Costa Atlántica Colombiana con un 63% de prevalencia, frente a un 36% en la región Central (55).

- Factores de riesgo biológico. Tiene relación directa con: El embarazo, al parecer existen factores inmunofisiológicos de las gestantes como el aumento en la expresión de la molécula HLAG, que inhibe la inducción de células *Natural Killer*, y otros factores que evitan el rechazo del feto por la madre, bajo el nivel de inmunidad celular, por lo tanto, aumentando la susceptibilidad de infección por *T.gondii*, u otros organismos intracelulares. El número de nacimientos; hay evidencias, que al aumentar el número de gestaciones ocurre un comportamiento similar en el sistema inmunológico de las gestantes al parir. Predisposición genética; estudios indican que hay una asociación entre el antígeno leucocitario humano (HLA), y la susceptibilidad a la infección por *T. gondii*. Igualmente se observó mayor frecuencia entre los caucásicos, del gen DQ·HLADQ en niños infectados por *Toxoplasma* con hidrocefalia (78%) que los infectados sin hidrocefalia (48%). Inmunodeficiencia; hay muchas evidencias que indican que la severidad de la infección por *T. gondii*. Está directamente relacionada con el estado inmunológico de la persona infecta. Ya que un individuo sano, es prácticamente asintomático, mientras un individuos inmunocomprometidos la infección puede causar una alta morbilidad y mortalidad (55).
- Factores de riesgo ligados al estilo vida. Exposición a los gatos, lo cual, está ligado directamente a las condiciones ambientales, y al grado de exposición del gato. Alimentos contaminados, comúnmente carne infectada poco cocida, vegetales contaminados mal lavados y preparados. Tomar agua no tratada; donde el solo proceso de hervir el agua previene en un alto porcentaje la transmisión del *Toxoplasma* (55).

### **2.2.6 Métodos de Diagnóstico.**



Las manifestaciones clínicas, en la gran mayoría de las mujeres embarazadas inmunocompetentes, al igual que en niños y adultos la primoinfección se presenta de manera asintomática (54) y la confirmación parasitológica es difícil de confirmar. En la mujer gestante la posible transmisión al feto condiciona una actitud diagnóstica y un tratamiento especiales. La toxoplasmosis congénita tiene una presentación clínica, así como un grado de transmisibilidad diferente, en función del periodo de la gestación en la que se produce, presentando una relación inversamente proporcional, la frecuencia de transmisión del *T. gondii* y la severidad de la enfermedad para el feto o recién nacido.

En general resulta difícil en muchas ocasiones determinar la presencia del *T. gondii*, debido a la gran adaptabilidad del parásito y la capacidad de cruzar las barreras biológicas, lo cual se asocia con la virulencia aguda. De igual forma, el grado de patogenicidad y severidad de las manifestaciones clínicas va a depender de la virulencia del parásito, el sitio de inoculación, la ruta de infección, la competencia de la respuesta inmune del huésped, la integridad de las mucosas y barreras epiteliales del huésped y en última instancia de la edad y características genéticas del huésped, que determinan la alta intervaribilidad individual de los infectados.

Para diagnosticar la toxoplasmosis, se han tenido en consideración aspectos clínicos fundamentales como: 1) factores de riesgo epidemiológicos de la madre, 2) manifestaciones clínicas, 3) imagenología como ultrasonido obstétrico y resonancia magnética, sin embargo, estos presentan limitaciones y presentan baja confiabilidad, es cuando los estudios paraclínicos, resultan ser fundamentales para la confirmación asertiva de la parasitosis, de forma indirecta, con técnicas serológicas y directamente por PCR, aislamiento (por cultivo celular o inoculación de ratones), hibridación e histopatología. Los métodos indirectos pueden ser útiles en pacientes inmunocompetentes, pero en aquellos con compromiso de su sistema inmunológico el diagnóstico se logrará por demostración directa del *T. gondii* en fluidos corporales como: orina, sangre y líquido cefalorraquídeo (54).





La técnica más comúnmente empleada para diagnosticar toxoplasmosis durante el embarazo, es la determinación de anticuerpos específicos para toxoplasmosis y seguimiento de la respuesta inmune ante este protozoo. Las IgM son indicadores de infección aguda, porque desaparecen luego de esta fase, detectados a las 2 semanas (Figura 17) de la infección por la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o ensayo inmunoabsorbente por aglutinación (ISAGA); aunque este anticuerpo nos indica infección reciente, puede persistir positiva por más de 12 meses o varios años (Figura 17) (54).

La prueba de Remington, detecta IgM específica por inmunofluorescencia indirecta y se considera positivo cuando es mayor de 1/20. La inmunofluorescencia indirecta (IFI), puede detectar anticuerpos anti IgG y anti IgM, la ventaja reside en su economía, y su desventaja es la alta tasa de falsos positivos en sueros que contengan otros anticuerpos o factor reumatoide y falsos negativos por bloqueo de IgG por parte de IgM. El ISAGA nos permite detectar IgM, IgA o IgE para toxoplasmosis con alta especificidad, pero es costoso, requiere entrenamiento o experiencia y no es automatizado, por lo que es utilizado solo en los centros de referencia.

Las IgG presentan el pico de concentración entre 6 y 8 semanas (Figura 17) luego de la infección y se mantienen positivos en forma indefinida, indicándonos con IgM, IgA e IgE negativas infección crónica o paciente inmunizada contra toxoplasmosis. Por ende no sirven para diagnosticar infección aguda salvo que se realicen dos pruebas separadas por un mínimo de 20 días y el título de la segunda sea 4 veces superior al de la primera, a lo que llamamos conversión serológica en muestras pareadas.

La IgA persiste positiva por más de 12 meses (Figura 17) y es de mucho valor para el diagnóstico de TC.

Las concentraciones de IgE específicas aumentan rápidamente luego de la infección y se mantiene detectable solo por 4 meses (Figura 17). Cuando el ISAGA IgE específico es positivo confirma la infección aguda. Su negatividad se usa para descartarla, pero se recomiendan combinarlo con otras técnicas. Este



test en infección aguda presenta: sensibilidad: 79,5 %, especificidad: 98 %, valor predictivo positivo: 95,5 % y valor predictivo negativo: 89,8 %.

La IgA y la IgE aparecen por lo menos una semana después que la IgM en toxoplasmosis aguda (Figura 17).

El ISAGA-PLUS IgA/IgM es el más sensible de los métodos convencionales para diagnosticar toxoplasmosis aguda y congénita. Su única limitación está dada en pacientes con linfadenopatías: en estos casos la persistencia de la IgA es prolongada (puede tratarse de una toxoplasmosis crónica) y, por tanto, es recomendable utilizar ISAGA IgE o una técnica IgM específica para el diagnóstico diferencial.

La prueba de avidéz-IgG. Consiste en un ELISA en el cual un agente desestabilizante de puentes de hidrógeno, como la urea, es empleado para disociar la unión entre las IgG específicas y el antígeno, de tal forma que en infecciones recientes las IgG con avidéz débil son casi totalmente disociadas del complejo antígeno-anticuerpo, mientras que en infecciones crónicas las IgG de alta avidéz (más del 50 %) permanecen más fuertemente unidas a los antígenos del *T. gondii*. Múltiples estudios de origen nacional como extranjero coinciden en que este método es seguro y valioso al momento de diferenciar infecciones agudas de infecciones crónicas.

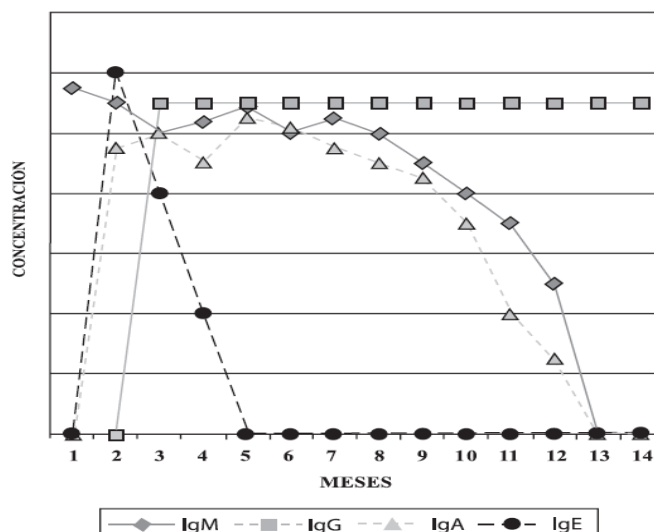


Figura 17. Anticuerpos desde la primoinfección.

Al volverse insuficiente la serología como método diagnóstico, es imperativo la detección directa del *Toxoplasma gondii*, incluso cuando se sospecha de toxoplasmosis por positividad de IgM específicos, es cuando se deben emplear técnicas como la inoculación de ratones y la PCR para detectar *T. gondii* por ejemplo en placenta, y el Western blots, para diferenciar los anticuerpos maternos de los anticuerpos del recién nacido (54).

Una publicación reciente en la Revista Infectio, de la Asociación Colombiana de Infectología, que se constituye en una de las guías más completas para la prevención, detección temprana y tratamiento de la TC, en Colombia, establece un flujograma de atención para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis durante el embarazo, partiendo de una prueba serológica para IgG, hasta el establecimiento de una estrategia de atención post-parto (Figura18) (55).

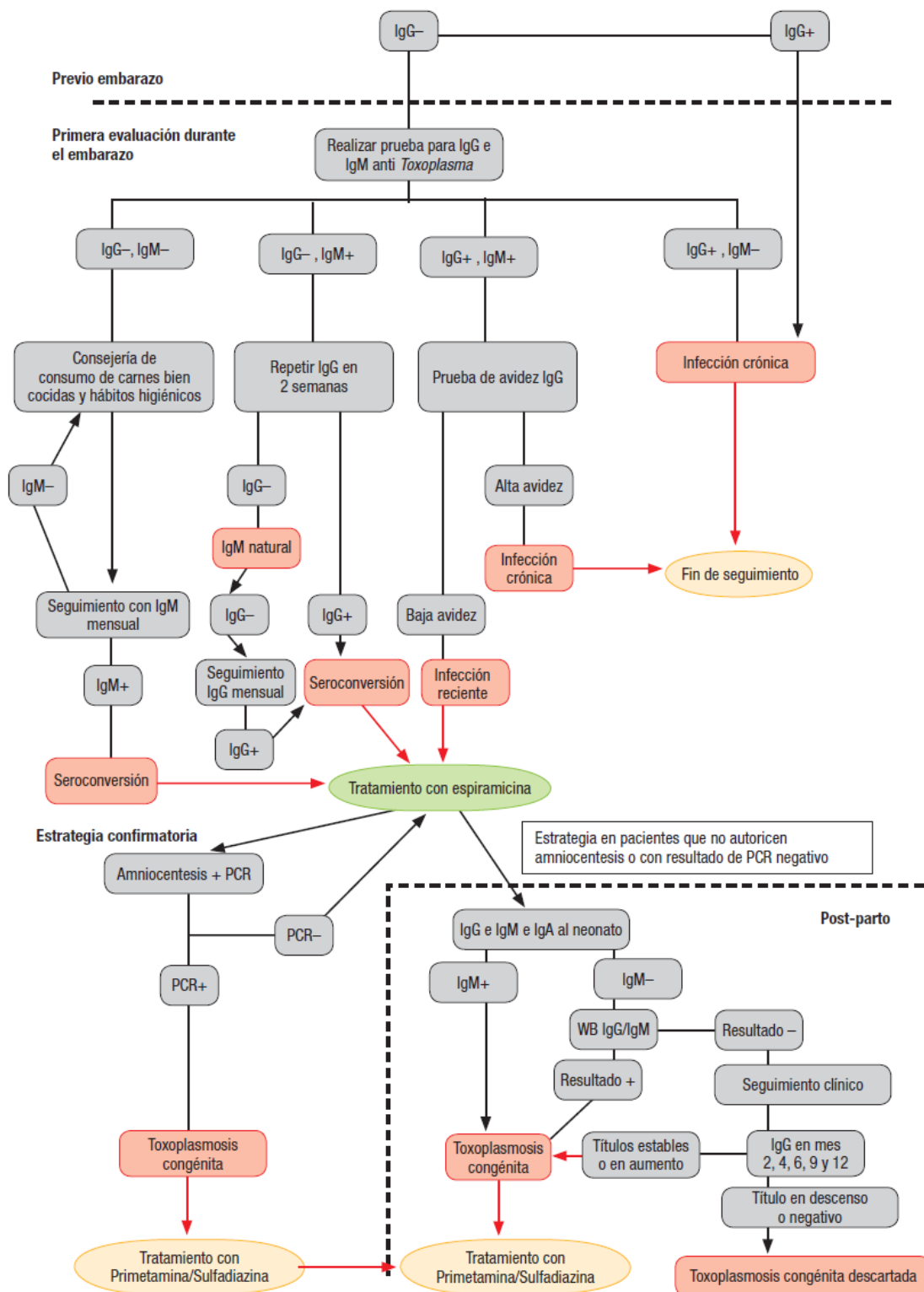


Figura 18. Flujograma de atención para el diagnóstico y tratamiento de la (TC) durante el embarazo.



### **2.2.7 Principales técnicas usadas para la detección de la actividad del parásito (*Toxoplasma gondii*), sus antígenos y/o su ADN.**

- *Enzimoimmunoensayo (EIA)*. Existen numerosos equipos comerciales y la falta de uniformidad en el antígeno y en la expresión de los resultados imposibilita la comparación entre ellos.

La EIA para IgM tiene las mismas interferencias que la IFI para IgM. Algunos equipos tienen baja especificidad dando lugar a falsos positivos que dificultan el diagnóstico.

Para la detección de IgM es preferible la técnica de ELISA-IgM-Doble Sándwich que posee mayor sensibilidad y especificidad.

- *ELISA* de gran sensibilidad y especificidad, automatizable, y con variantes: ELISA Indirecta, ELISA de Captura, MEIA (Micropartículas), para diferenciar IgM, IgG, IgA, e IgE y ELISA-IgG con un 95-98% de concordancia con los resultados obtenidos por IFI, títulos habituales en la población: 3-500UI/ml.
- *Inmunofluorescencia indirecta (IFI)*. Los títulos concuerdan satisfactoriamente con la reacción de Sabin- Feldman.

La IFI anti-IgM o test de Remington, tiene interferencias. Los títulos elevados de IgG pueden dar lugar a un resultado falso negativo. El factor reumatoideo o el factor antinuclear pueden dar resultados falsos positivos. Se requiere un pretratamiento con una anti-IgG, para eliminar la interferencia. La reacción tiende a negativizarse a partir de los 6 meses.

- *Reacción de Sabin-Feldman (SF)*. Según la Organización Mundial de la Salud es la prueba de referencia para el diagnóstico de la toxoplasmosis, considerando que es la de mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad.



La reacción utiliza toxoplasmas vivos y el mantenimiento de la cepa requiere un bioterio o una línea de cultivo celular sólo disponible en laboratorios especializados (56).

La prueba de *Sabin y Feldman*, fue descrita en 1948. Con ella se definieron los estándares con los que las demás pruebas para la detección de IgG deben compararse. Un título de 1/16 a 1/256 es compatible con infección antigua inactiva. Mide fundamentalmente IgG. Consiste en comprobar la lisis de los toxoplasmas en presencia de los anticuerpos del suero problema (57).

- *Prueba de inmunoabsorción y aglutinación (ISAGA)*. Es una técnica de inmunocaptura altamente sensible y específica. Es la técnica más sensible, con un 98% de efectividad en las primoinfecciones. Se la utiliza también para la detección de IgM, IgA e IgE como marcadores de la fase aguda de la infección en la embarazada y en el recién nacido. En el adulto, la IgM se torna negativa entre los 9 meses y el año del inicio de la infección, la IgA entre los 6 y 9 meses y la IgE entre los 4 y 6 meses. El hallazgo de estas inmunoglobulinas, que no atraviesan placenta, en sangre del recién nacido es indicio de infección prenatal.
- *Aglutinación directa (AD)*. Es una técnica sencilla y accesible a laboratorios de baja complejidad(57).La Aglutinación emplea un antígeno que consiste en trofozoitos enteros formalinizados o fijados con acetona. La muestra de suero debe ser previamente tratada para eliminar las IgM. La lectura de los resultados da títulos muy altos (57).
- *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Permite detectar fracciones de ADN del parásito en muestras de sangre del cordón o del líquido amniótico. Es útil para diagnosticar infección prenatal.
- *Aislamiento del parásito por inoculación en el ratón*. Se realiza a partir de muestras obtenidas de líquido amniótico o de sangre de cordón del



neonato. El hallazgo positivo es muestra indudable de infección prenatal (56).

Existen numerosas pruebas para el diagnóstico de la toxoplasmosis en el embarazo; el objetivo que comparten es distinguir entre una infección adquirida durante la gestación o antes del embarazo; resultado fundamental independientemente del tipo de pruebas usadas para el diagnóstico de la toxoplasmosis es, poder determinar si la infección fue adquirida antes o durante el embarazo (55).

### **2.2.8 Determinación de anticuerpos específicos.**

- *Anticuerpos IgG.* La presencia de anticuerpos IgG implica que ha habido contacto entre el paciente y el parásito en algún momento de la vida. La infección aguda o relativamente reciente suele acompañarse con títulos elevados, pero no se trata de un criterio diagnóstico definitivo. Si existe la evidencia de una seroconversión o de un aumento significativo del título de IgG entre dos muestras separadas 3-4 semanas, es diagnóstica de infección reciente. En las embarazadas y en los pacientes con inmunodeficiencia grave, el principal valor de las IgG *consiste en la discriminación de individuos seronegativos.*
- *Anticuerpos IgM.* Clásicamente, su detección fue considerada como el marcador de la fase aguda de la enfermedad. La evidencia de que los títulos de IgM anti-Toxoplasma pueden permanecer detectables durante muchos meses, o incluso años, después de producida la infección primaria ha cambiado sustancialmente este concepto. En este sentido, el principal valor de las IgM *radica en que su ausencia prácticamente descarta la infección reciente.* La presencia de IgM, por el contrario, implica la necesidad de proseguir el estudio de un paciente determinado.
- *Anticuerpos IgA.* Considerado también como un marcador de fase aguda, se ha comprobado que, si bien al igual que la IgM puede también permanecer positivo varios meses después de la primoinfección, el



porcentaje de IgA residuales es mucho menor que el de las IgM. En el adulto, la cinética de la producción de IgA específica es prácticamente paralela a la de la IgM, *aunque aparece un poco más tarde y desaparece más precozmente.*

- *Anticuerpos IgE.* Algunos estudios iniciales sugieren que las IgE antitoxoplasma aparecen pronto, al inicio de la enfermedad, y desaparecen más rápidamente que los anticuerpos de las clases IgM e IgA. Sin embargo, esta técnica no está comercializada y por el momento existe poca experiencia para establecer qué puede aportar al diagnóstico.
- *Avidez de los anticuerpos IgG.* Método descrito por Hedman et al en 1989, se basa en la distinta fuerza de la unión entre antígeno y anticuerpo en la infección aguda y en la crónica. Algunos estudios demuestran que durante las 20 primeras semanas después de la infección, predominan las *IgG de baja avidéz, por lo que se han de interpretar como altamente indicativo de infección aguda,* mientras que el predominio de las *IgG de elevada avidéz, sería indicativo de infección pasada o crónica, con las limitaciones antes comentadas (58).*

### **2.2.9Objetivos del control de la toxoplasmosis en la gestante**

- Localizar todas las gestantes seronegativas mediante una determinación de IgG específica, realizada lo más precozmente posible. La negatividad de esta determinación indica susceptibilidad a la infección, por lo que la estrategia consistirá en: a) instaurar unas medidas preventivas muy estrictas destinadas a evitar el contagio, y b) aconsejar un seguimiento serológico periódico. El seguimiento serológico consistirá en determinaciones de anticuerpos IgG realizadas periódicamente, cada 8-12 semanas, hasta el final del embarazo, con el fin de detectar las posibles seroconversiones. Toda seroconversión de IgG es diagnóstica de infección aguda materna.





- Detectar las gestantes seropositivas con inmunidad permanente frente al parásito. Ante la positividad de los anticuerpos IgG en el cribado, se procederá a un estudio de IgM específica. La negatividad de ésta indicará infección pasada, sin prácticamente riesgo de infección congénita, puesto que sólo la infección primaria se ha asociado a transmisión vertical.

## **2.3 TRATAMIENTO Y DOSIFICACIÓN**

En el caso de que se confirme la infección fetal se aconseja realizar tratamiento específico con pirimetamina, y una sulfonamida, la más difundida es la sulfadiazina, que al igual que otras sulfas tiene una acción sinérgica con la pirimetamina. No obstante se debe tener cuidado en su administración antes del primer trimestre de embarazo para la SDZ, y no antes del segundo trimestre para la PYM, por su efecto teratogénico, por lo cual, se utiliza en muchos casos la espiramicina con menor toxicidad reduciendo notoriamente la posibilidad de infección en este periodo (59).

En informe publicado de la OMS en 1996, se reporta una información referente al uso de las preparaciones comerciales de pirimetamina con sulfadoxina o sulfametoxazol, los cuales al parecer no son satisfactorias a este respecto. La primera de esas asociaciones se ha visto implicada en casos graves de síndrome de Stevens-Johnson y necrólisis epidérmica tóxica, y otras manifestaciones al igual que dudas sobre los niveles terapéuticos durante la administración (55, 59), mientras que en sujetos tratados con dosis profilácticas de la última se ha señalado la aparición de encefalitis toxoplásmica (59).

Por otro lado, recientemente un reporte de la revista *Infectio*, de diciembre de 2012, menciona la existencia de muchos estudios que utilizan la combinación de SDX – PYR, de manera similar a la combinación SDZ – PYR, y se recomienda como alternativa terapéutica en caso de efectos adversos y/o a limitaciones a primera elección de tratamiento y a juicio del médico, al igual que con otras sulfas como: clindamicina, sulfadoxina o azitromicina (55).

**Tabla 6** Tratamiento de la toxoplasmosis congénita

Características de la infección	Tratamiento	Dosis	Duración
Infección congénita sintomática	P	Inicio: 1 mg/kg/12 h, durante 48 h Posteriormente: 1 mg/kg/día, hasta los 6 meses Del mes 6 al 12: 1 mg/kg lunes-miércoles y viernes. Dosis máxima: 25 mg. 100 mg/kg/día, repartido en 2 dosis	12 meses
Infección congénita sintomática con afectación LCR o coriorretinitis activa con alt. visión <sup>a</sup>	S	5-10 mg/3 días por semana	12 meses y 1 semana
	P + S + AF Corticoides	Igual que en apartado anterior 1 mg/kg/día, repartido 2 veces al día	Igual que en apartado anterior. Hasta normalización LCR o reducción inflamación de la retina
Infección congénita asintomática	P + S + AF <sup>b</sup>	Igual que en el primer apartado. En esta situación a partir del 2-6 mes puede pasarse a administrar dosis de pirimetamina a días alternos hasta el mes 12	12 meses
Infección dudosa	P + S + AF	Igual que en el primer apartado	Se mantendrá hasta descartar la infección (seguimiento de IgG). De confirmarse la pauta se mantendrá durante 12 meses

AF: ácido fólico; P: pirimetamina; S: sulfadiazina.  
<sup>a</sup> Se considera que el LCR esta alterado si las proteínas son > 1 g/dl. Coriorretinitis activa que afecte a la mácula o esté cerca de la misma.  
<sup>b</sup> No se dispone de información respecto al tratamiento de la infección asintomática. La mayoría de los expertos recomiendan tratamiento durante 12 meses; una alternativa en esta situación sería plantear un tratamiento corto, de 3 meses, siguiendo las recomendaciones de los autores daneses.

Figura 19. Esquema de tratamiento para TC, según la sociedad española de infectología pediátrica.

En el anterior reporte, la Asociación española de Pediatría, enfatizan el tratamiento especialmente con: PYR, SDZ y Acido Fólico; no dejando evidenciar tratamientos con otros fármacos e incluso con la sulfadoxina (60).

Similares reportes se evidencian en muchos trabajos donde incluso aparecen otros antibióticos como la espiramicina, para ser usadas en etapas más críticas de una posible infección, al parecer por ser menos severo su efecto sobre el feto en etapas tempranas del embarazo(61).

La TC está incluida como una de las prioridades del Plan Nacional de Salud en el capítulo de implementación de Estrategias para Línea de Política 2 y 3 dentro del Objetivo 1: Mejorar la Salud Infantil. La toxoplasmosis congénita está incluida como una de las prioridades del Plan Nacional de Salud en el capítulo de implementación de Estrategias para Línea de Política 2 y 3 dentro del Objetivo 1: Mejorar la Salud Infantil (62).



### **2.3.1 Datos de medicación. En evidencia o sospecha de toxoplasmosis congénita en recién nacidos**

Se administra pirimetamina: 1 mg/kg cada 12 h los 2 primeros días, seguido por 1 mg/kg por día por 1 año, y sulfadiazina a dosis de 50 mg/kg cada 12 h y ácido fólico (10 mg 3 veces/semana) hasta 1 semana posterior a suspensión de pirimetamina. Diversos estudios han presentado otras combinaciones de pirimetamina-sulfadoxina, aparte a la expuesta en el resumen de la evidencia, así:

Pirimetamina + sulfadoxina tabletas (1 comprimido = 500 mg de sulfadoxina y 25 mg de pirimetamina). Se da disuelto e igualmente con base en la dosis de sulfadoxina 25 mg/kg cada 8 días. Se da una dosis de carga de 50 mg/kg según sulfadoxina el primer día, y luego 25 mg/kg en dosis única semanal hasta el primer año de vida asociado a ácido fólico 7,5 mg/día (media tableta de 15 mg). Existe controversia sobre el uso de esta combinación, dado el riesgo de efectos adversos y dudas sobre los niveles terapéuticos durante la administración a intervalos semanales.

Pirimetamina 1 mg/kg/día vía oral más clindamicina 30 mg/kg/día intramuscular dividida en 3 dosis en fase aguda y luego pasar a vía oral a 20 mg/kg/día dividido en 3 dosis (clindamicina suspensión 75 mg = 5 ml) para mantenimiento hasta el primer año de vida(55).

2.3.1.1 Sulfonamidas: Son un grupo de fármacos antibacterianos sintéticos que inhiben la síntesis del ácido fólico por inhibición competitiva de la dihidropteroato sintetasa (DHPS). Esta enzima toma ácido p-aminobenzoico (PABA), junto con pteridina, para sintetizar el dihidropteroato, que es convertido subsecuentemente en folato. Las sulfonamidas son análogos estructurales del PABA, compitiendo con éste por el sitio activo de la DHPS(19, 63).

Los mamíferos no sintetizan su propio folato, sino que deben tomarlo de los alimentos, razón por la que no son afectados por las sulfonamidas; algunas \*bacterias capaces de utilizar folato, que es una molécula muy grande para



poder ser tomada del medio por la mayoría de los microorganismos, son intrínsecamente resistentes a las sulfonamidas. Las sulfonamidas(19, 63, 64), Figura 20, derivan del trabajo con la sulfona - midocrisoidina, o Prontosil, sintetizada por Josef Klarer y Fritz Mietzsch, y luego probada por Gerhard Domagk (Premio Nobel de Medicina en 1939) como antibacteriano en modelos animales, en 1931. El Prontosil en realidad es metabolizado a una sulfonamida más simple, *p*-aminofenilsulfonamida, luego en estudios posteriores 1938, se concluye que el grupo azo, del prontosil se reduce “in vivo”, por acción de la enzima ozoreductasa formando sulfanilamida, que es el producto activo(19),sustancia que es la que tiene actividad antibacteriana. Son activas contra los \*cocos Gram-positivos, las \*actinobacterias, las \*enterobacterias, \**Bacteroides fragilis*; a las concentraciones alcanzadas por la aplicación tópica, \**Pseudomonas aeruginosa* es también inhibida. Son activas contra diversos \*protozoarios y \*hongos. Las sulfonamidas pueden agruparse en cuatro categorías: (a) las que se absorben y excretan rápida o medianamente, como el sulfisoxazol (\* $t_{1/2}$  5-6 h), el sulfametoxazol (11 h) y la sulfadiazina (10 h), y la sulfapiridina, el sulfatiazol, la sulfamerazina, la sulfadimidina, el sulfafurazol y el sulfametizol; (b) las que se absorben bien pero se eliminan lentamente, como la sulfadoxina ( $t_{1/2}$  100-230 h) y la sulfame - toxipirazina; (c) las que casi no se absorben y se emplean sólo para combatir infecciones intestinales, como la sulfasalazina; y (d) las que se usan tópicamente, como la sulfacetamida y la sulfadiazina de plata. Una de las sulfonamidas más usadas es el sulfametoxazol, en combinación con el \*trimetoprim (cotrimoxazol); esta sulfonamida alcanza concentraciones de 37  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cuando se administra una dosis oral de 1 g, con una  $t_{\text{max}}$  de 4 h y un volumen de distribución de 20 L para un adulto de 70 kg.

Por su parte, una dosis oral de 4 g de sulfadiazina produce \* $C_{\text{max}}$  de 40-60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en 3 h, y de sulfisoxazol la misma dosis alcanza  $C_{\text{max}}$  de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en 2-4 h. Se eliminan mayoritariamente por la orina, pero la tasa de eliminación varía de fármaco a fármaco: las de vida media corta se eliminan rápidamente alcanzando concentraciones altas en la orina, y las de vida media larga alcanzan concentraciones bajas. Las sulfonamidas se usan en el manejo de infecciones

urinarias y gastrointestinales, y se usaron para la meningitis, infecciones respiratorias, chancroide y linfogranuloma, pero ya hay mejores opciones para tratamiento. En cambio, las sulfonamidas siguen siendo fármacos de elección en el tratamiento de la \*nocardiasis, la \*toxoplasmosis (en combinación con pirimetamina), la \*malaria (en combinación con pirimetamina y mefloquina), la neumonía por \**Pneumocystis jirovecii* (como cotrimoxazol), las quemaduras (con la aplicación tópica de sulfadiazina de plata) (63).

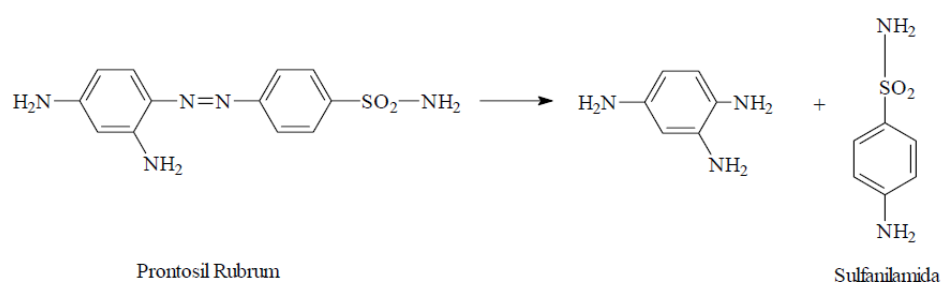


Figura 20. Obtención de la sulfanilamida.

A partir de este compuesto se desarrollan gran cantidad de productos derivados de la sulfanilamida, por sustitución de los hidrógenos aminados por radicales, estableciéndose la clasificación siguiente:

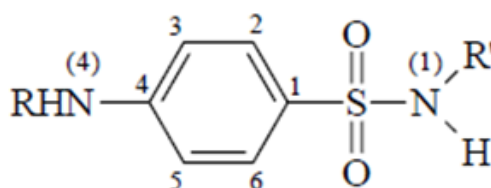
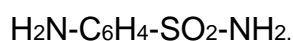


Figura 21. Estructura química de la sulfanilamida.

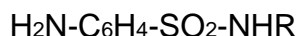
La nomenclatura de la sulfanilamida se establece como sigue: 1-Para-amino-benceno-sulfonamida



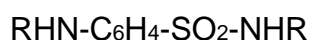


Para sus derivados, dependiendo de la sustitución se establecen los siguientes grupos:

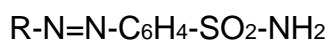
1.- Derivados obtenidos por la sustitución del hidrógeno del nitrógeno sulfamídico:



2.- Derivados obtenidos por la sustitución de átomos de hidrógeno en el nitrógeno anilínico y sulfamídico, conjuntamente.



3.- Derivados de tipo azoico, obtenidos por la formación de la sal de diazonio y la posterior copulación con diversos reactivos.



Estos nuevos productos desarrollados abren un campo de posibilidades terapéuticas, en una amplia gama de infecciones.

De los compuestos anteriores, el estudio se centrara en los siguientes:

- Sulfadoxina (SDX), Fármaco derivado de la sulfanilamida (p-aminobenzenosulfonamida) (Figura 21), sulfadoxina, 4-Amino-N-(5,6-dimetoxi-4-pirimidinil)-benzenesulfonamida  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$  (Figura 16), que presenta un efecto residual lento, mayor que muchas otras sulfanilamidas, que actúa sinérgicamente con gran eficiencia con el fármaco pirimetamina, que se comercializa en el país, y es ampliamente usado en el tratamiento contra la toxoplasmosis y la malaria. Tiene un peso molecular 310,33 g/mol, y este laboratorio no presenta reporte de  $\text{LD}_{50}$  (64).

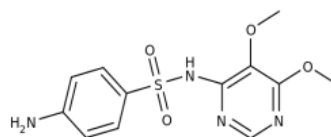


Figura 22. Sulfadoxina.

- Sulfadiazina: La sulfadiazina (SDZ) 4-amino-N-(2-pirimidinil)benzenesulfonamida ( $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ ), (figura 22), es probablemente una de las sulfonamidas más ampliamente utilizado en el mundo, es de amplio uso médico y veterinario; inhibidor del metabolismo del ácido fólico en algunas bacterias y protozoos; actúa sinérgicamente con la pirimetamina. Por razones farmacocinéticas, se ha usado en gran medida, como sulfamida apropiada para asociarla a la pirimetamina en el tratamiento de la toxoplasmosis (19, 63).

La sulfadiazina se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y se distribuye por todo el organismo. La semivida en el suero es de unas 10-12 horas. Después de acetilarse parcialmente en el hígado, se elimina por la orina(61).Presenta el inconveniente de ser poco comercializado en el país. Presenta una  $LD_{50}$  oral en ratón de 1.500 mg/kg y un peso molecular de 250,28 g/mol (64).

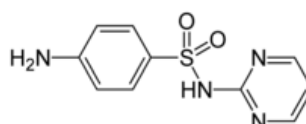


Figura 23. Sulfadiazina.

Otro medicamento, de acción sinérgica, que no es del tipo sulfa, pero que juega un papel fundamental en el tratamiento es:

- Pirimetamina: La 5-(4-clorofenil)-6-etil-2,4-pirimidindiamina,  $C_{12}H_{13}ClN_4$ , es un inhibidor del metabolismo del ácido fólico que actúa sinérgicamente con las sulfamidas para destruir los taquizoitos. Las altas concentraciones requeridas para tratar la toxoplasmosis pueden interferir en el metabolismo del ácido fólico del paciente. La vida media plasmática tras

la administración oral es de unos cuatro días. La pirimetamina se metaboliza parcialmente en el hígado y acaba eliminándose por la orina. Una sobredosificación de pirimetamina puede ser mortal. Los signos característicos de sobredosificación comprenden anorexia, vómitos y convulsiones. El vómito provocado o el lavado gástrico son útiles si se aplican a las pocas horas de la ingestión. Las convulsiones pueden controlarse con diazepam intravenoso (61).

Presenta una LD<sub>50</sub> oral en ratón de 440 mg/kg y un peso molecular de 248,71 g/mol (64).

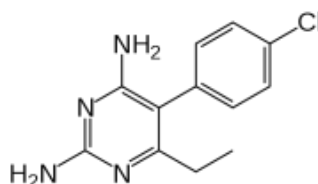


Figura 24. Pirimetamina.

### 2.3.2 Sinergismo farmacológico de SDX-PYR

En la Figura 25, muestra esquemáticamente como a SDX y la PYR inhiben de manera competitiva las enzimas dihidropteroato sintetasa (DHTS) y la dihidrofolato reductasa (DHFR), respectivamente (65, 66).

Estas enzimas catalizan pasos importantes secuenciales en la generación de los derivados del folato. Las células en división rápida, como los plasmodios (también las células neoplásicas y las bacterias), dependen de los derivados del folato como cofactores para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos. La PYR es 1000 veces más activa contra la DHFR del plasmodio que contra la enzima de los mamíferos. La combinación de la inhibición de la DHTS y la DHFS parece ser sinérgica (67).

Tanto la SDX como la PYR son bien absorbidas luego de su administración por vía oral y alcanzan las concentraciones plasmáticas pico en aproximadamente 4 horas (2-6 horas). Ambos agentes tienen una elevada unión a proteínas (>90% y



87%, respectivamente), lo que resulta en una depuración prolongada, con una vida media de eliminación de 169 (100-230) y 111 horas (54-148 horas), respectivamente. Las concentraciones plasmáticas pico después de una única dosis de 500 mg de SDX y 25 mg de PYR por vía oral son de aproximadamente 50-75 µg/ml y 0.13-0.4 µg/ml, en igual orden (67).

La dosis recomendada de SDX/PYR para mujeres embarazadas que reciben tratamiento preventivo e intermitente, es de 3 comprimidos o 1500 mg de SDX y 75 mg de PYR. Tanto la primera como la segunda se distribuyen ampliamente en los tejidos corporales, cruzan en forma rápida la placenta y son excretadas en la leche materna. Las concentraciones fetales de SDX y PYR son, en promedio, un 97% (65-116%) y 66% (43-103%) de los niveles maternos, respectivamente. Casi el 5% de la SDX se acetila en el plasma y la droga no acetilada remanente se excreta principalmente sin cambios por el riñón; en cambio, la PYR se metaboliza en el hígado y la excreción se produce sobre todo por los riñones. La insuficiencia renal retrasa la depuración de ambas drogas (67).

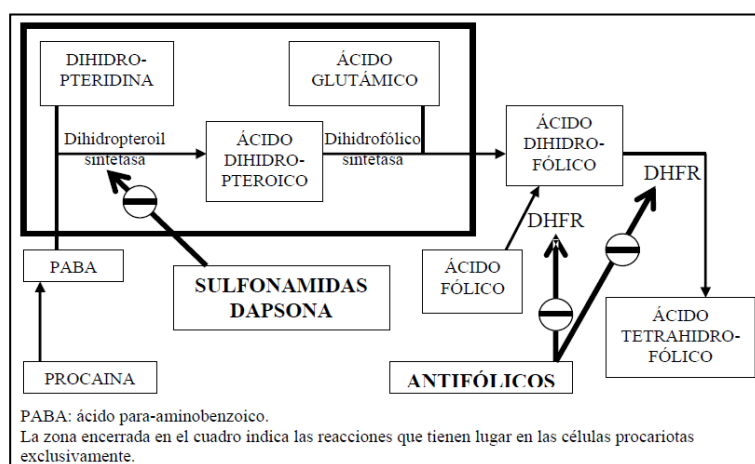


Figura 25. Pasos en el metabolismo del folato bloqueados por las sulfonamidas, y análogos de la dihidropteridina (trimetoprima y la pirimetamina).

Estos fármacos han sido analizados por RP-HPLC, y otras técnicas cromatográficas por muchos años, aprovechando que presentan una banda claramente definida con un máximo de absorción entre 250 y 280 nm, con detectores ultravioleta como el arreglo de diodos (DOD). Estos métodos se han



empleado en la determinación de residuos de sulfonamidas en diferentes matrices y fluidos biológicos (68).

## **2.4 PROCESO DE IMPLEMENTACIÓN**

Este proceso radica en “La estandarización, que es un procedimiento estadístico que consiste en verificar y documentar, que exista un alto grado de seguridad, en la obtención de resultados que deberían ser precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos” (69)

En la estandarización de un método se determinan además de los parámetros fundamentales de exactitud (relacionada con la trazabilidad) y de precisión (relacionada con la incertidumbre), los parámetros secundarios de selectividad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación (69), además de otros que por las condiciones particulares y específicas de las muestras objeto de análisis y de las condiciones de experimentación se determinaron.

Resulta pertinente hacer mención que el trabajo realizado se enmarca y se hace referencia principalmente a todos los elementos que sustentan y respaldan un proceso de estandarización, y no directamente al correspondiente a una validación, debido a que a nivel estadístico, por las mismas condiciones de trabajo, acceso a otro laboratorio de referencia, a la disponibilidad de estándares primarios, algunos parámetros de precisión intermedia y la replicación por otro analista, no permitieron que algunos parámetros no fueran susceptibles de determinarse directamente; sin embargo, toda la investigación se realizó siguiendo los parámetros establecidos en los protocolos de quimiometría para bioanálisis cromatográficos, con la mayor rigurosidad metodológica, instrumental y estadística posible (69-71).

### **2.4.1 Comprobación de los atributos del procedimiento de análisis**

Teniendo como objetivo determinar la existencia de los fármacos en el suero y otros fluidos corporales de niños con TC, es necesario establecer técnicas de análisis con un alto nivel de sensibilidad, que sean repetibles y



reproducibles en el tiempo, para que permitan poder valorar con precisión y exactitud su presencia para poder realizar un seguimiento de los niveles de los fármacos en tiempo real, teniendo en consideración la variabilidad interindividual en la asimilación y respuesta terapéutica de los pacientes, que brinde mayores elementos de juicio científico para establecer las estrategias terapéuticas más adecuadas para evitar posiblemente efectos secundarios, y perdida en el tiempo de tratamiento, y probablemente secuelas a futuro.

Por lo anterior, y para verificar la calidad de los resultados fruto del análisis, es esencial evaluar los atributos siguientes:

2.4.1.1 Linealidad: La linealidad de un método analítico hace referencia a la proporcionalidad de la concentración de analito y su respuesta. De igual forma, la guía ICH Q2(R1)(72), establece que la linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados de las pruebas que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad de analito).

De manera conjunta se establece el “Rango de Linealidad”, que es equivalente, al intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede realizar el dosaje por interpolación en una curva estándar (70), la ICHQ2(R1)(72) también recomienda que para establecer la linealidad se utilicen normalmente un mínimo de 5 concentraciones de analito.

2.4.1.2 Selectividad/Especificidad: La selectividad es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en la presencia de otros componentes en la muestra. Para la determinación de la selectividad, en el análisis de muestras blanco de una determinada matriz biológica (plasma, orina, u otra matriz) esta debe ser obtenida de al menos seis fuentes. Cada muestra blanco debe ser probada para determinar interferencias, y la selectividad debe ser probada en el límite inferior de cuantificación (LQ).



Las sustancias que puedan interferir potencialmente en una matriz biológica son componentes de la matriz endógena, metabolitos, productos de descomposición, y en el estudio actual, la medicación concomitante y otros xenobióticos exógenos. Si el método está destinado a cuantificar más de un analito, cada analito debe ser analizado para asegurarse de que no hay interferencia (71).

2.4.1.3 Exactitud: Se define como la cercanía entre el valor obtenido en un análisis determinado y el valor (concentración) que es aceptado convencionalmente como verdadero(71).

A través de la exactitud se puede determinar el error sistemático o tendencia de un método. Éste error permite conocer si los resultados se desvían de forma constante respecto a los valores esperados; es decir, que la media experimental difiera del valor verdadero(70).

La exactitud se determina por duplicado en las muestras que contienen cantidades conocidas del analito. La exactitud debe medirse usando un mínimo de cinco determinaciones por concentración, y se recomienda un mínimo de tres concentraciones en el intervalo de concentración establecido. El valor medio debe estar dentro del 15% del valor real, excepto en el LQ, donde no debe haber una desviación superior de 20%. La desviación de la media del valor verdadero sirve como la medida de la exactitud(71).

Según lo referenciado por la (AEFI-2001), la exactitud se debe expresar como el *porcentaje de recuperación* en la valoración de una cantidad conocida de analito sobre el muestreo como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza(69).

2.4.1.4 Precisión: Se puede definir como un procedimiento analítico que mide el grado de concordancia entre los resultados obtenidos de ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea de matriz biológica (71).



La precisión se puede considerar en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, a la cual, se expresa normalmente como la varianza, desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones (72).

- Repetibilidad: expresa la precisión en las mismas condiciones de funcionamiento durante un corto intervalo de tiempo. Repetibilidad también se denomina precisión intra-ensayo.
- Precisión intermedia: expresa las variaciones intra-laboratorios: diferentes días, diversos analistas, equipos diferentes, etc
- Reproducibilidad: expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos, por lo general se aplica a la estandarización de la metodología).

El objetivo de evaluar la precisión es por tanto conocer la variabilidad del método de ensayo, el cual se debe a errores aleatorios inherentes a éste. La precisión debe medirse utilizando un mínimo de cinco determinaciones por concentración, y un mínimo de tres concentraciones en el intervalo de análisis prescrito. La precisión determinada en cada nivel de concentración no debe tener un coeficiente de variación (CV) superior del 15%, a excepción del Limite Inferior de Concentración (LQ), el cual podría ser máximo del 20% (71).

2.4.1.5 Sensibilidad: En el análisis cuantitativo, la sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede generar un resultado significativo, que se puede definir como la pendiente de la recta de calibración la cual puede ser medida en cualquier punto de la recta siempre y cuando su representación sea lineal (70). Los parámetros a definir cuando se evalúa la sensibilidad de un método son:

- Límite de detección (LD): Se define como la menor concentración de un analito que un procedimiento de bioanálisis puede diferenciar con fiabilidad del ruido de fondo (71). La determinación del límite de detección



tiene carácter cualitativo. Varios enfoques para la determinación del límite de detección son posibles, dependiendo de si el procedimiento es o no instrumental (72).

- Límite inferior de cuantificación (LQ): Es la cantidad más baja de un analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud adecuada (71).

2.4.1.6 Estabilidad: es otro atributo importante a considerar para tener un estimativo del grado de deterioro posible de un analito en el tiempo, como lo menciona la FDA “La estabilidad del fármaco en un fluido biológico es una función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del fármaco, la matriz, y el sistema de contenedores”(71).

La estabilidad de un analito en una matriz y con bases particulares, solo es relevante para ese sistema en particular, y dichas condiciones no se pueden extrapolar a otro sistema(71).

Para evaluar la estabilidad se debe tener en consideración los aspectos siguientes:

- La estabilidad de los analitos durante la toma de muestra y manipulación.
- El almacenamiento por largo tiempo y a temperaturas de congelación, y por corto tiempo a temperatura ambiente.
- Repetidos ciclos de congelado y descongelado.

2.4.1.7 Robustez y replicabilidad entre días: Para considerar la evaluación de la robustez (*Robustness*), es decir la capacidad de un método para permanecer inalterado ante pequeños pero deliberados cambios, pero que produzcan resultados validos frente a las condiciones descritas en un método, pero que puedan ser susceptibles de ocurrir en la aplicación de un procedimiento analítico real(69), siendo los siguientes algunos ejemplos validos:

- Estabilidad de las soluciones analíticas.
- Tiempo de extracción.



En el caso de la cromatografía líquida, ejemplos de las variaciones típicas son:

- Influencia de las variaciones de pH en una fase móvil.
- Influencia de las variaciones en la composición de la fase móvil.
- Columnas diferentes (distintos lotes y / o proveedores).
- La temperatura.
- Caudal.

Es importante hacer una diferenciación entre los términos en inglés *Robustness*, y *Ruggedness*, los cuales, al traducirse se definen simultáneamente como robustez, pero que en la práctica son diferentes. Dichos parámetros se podrían definir respectivamente en unos términos muy generales sin entrar a profundizar en los conceptos como: replicabilidad de método, bajo pequeñas alteraciones deliberadas; y como el grado de reproducibilidad de los resultados mediante el análisis de las mismas muestras sometidas a una variación de condiciones tales como laboratorios diferentes, analistas e instrumentos diferentes, lotes de reactivos, días, tiempo, y temperaturas diferentes entre otros (69).

**2.4.1.8 Incidencia de la matriz de disolución:** Entendido éste como la alteración directa, o indirecta en la respuesta o señal analítica, debida a la presencia de los analitos deseados para el análisis, o de otras sustancias interferentes en la muestra(71), cuya matriz puede ser de características variadas y con alto grado de complejidad, como ocurre, en el caso de muestras biológicas (suero, orina, plasma, entre otras). Por consiguiente resulta importante mencionar, que no podemos hacer similitud con el término “Efecto Matriz”, ya que en el procedimiento analítico establecido no se emplea un estándar interno.

## **2.4.2 Respuesta terapéutica**

Tal y como lo menciona C. Everett Koop “*Los medicamentos no funcionan en aquellos pacientes que no los toman*”. Resulta muy complejo hacer un seguimiento profundo a cerca del grado de compromiso de cada paciente y su comportamiento frente a las recomendaciones de los profesionales de la salud que le atienden, donde están implícitos una serie de factores que inciden directamente en el éxito terapéutico como: El proceder de un paciente en



relación con los medicamentos que ha de tomar, el seguimiento de una dieta o los cambios que ha de hacer en su estilo de vida, y la dependencia de terceros para el suministro de los mismos (73).

Todos estos aspectos se enmarcan en el término conocido como: Adherencia Terapéutica Farmacológica (73), cuyas particularidades se definen:

- Primaria:
  - Aquella prescripción que no llega a retirarse de la farmacia.
- Secundaria:
  - Alteración en la dosis correcta.
  - Cambio en los intervalos de dosificación.
  - Olvido en la administración del fármaco o aumento en la frecuencia de dosis.
  - Suspensión del tratamiento antes del tiempo recomendado.

Todas estas particularidades que solo el paciente (o su progenitora, en el caso de los infantes con infecciones congénitas), tienen control, y conocimiento.

Con los antecedentes establecidos, la orientación no paramétrica, hacia la confrontación de los resultados de medición de los niveles de los fármacos en muestras biológicas, frente a niveles de anticuerpos y otros metabolitos presentes en el suero sanguíneo, podrían ser procedente para evaluar y establecer una posible explicación a una respuesta terapéutica dada, en la indagación plantea en el presente trabajo, y como resultado de las pruebas de normalidad de los datos obtenidos.

## **2.5 CONCLUSIONES**

A pesar que el gobierno ha tenido importantes iniciativas para el tratamiento y control de la TC, todavía, sigue siendo la concientización y promulgación de hábitos alimentarios saludables, que sean la principal barrera para evitar la infección parasitaria, que no se le ha dado la trascendencia dentro





de las políticas en salud, existiendo una alta vulnerabilidad social en las comunidades, mas disminuidas económicamente. Es por lo anterior, que todos los esfuerzos que se realicen al respecto que permitan visibilizar estas problemáticas, y más aún, hacer una masificación de diagnósticos con un mayor rigor científico como la apropiación y aplicación de técnicas cromatográficas como HPLC, que permitan cuantificar en tiempo real el nivel de asimilación farmacocinética de los medicamentos en los tratamientos terapéuticos.



## CAPÍTULO 3

### DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO RP-HPLC-DAD PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN SUERO Y PLASMA SANGUÍNEO

---

*En el siguiente capítulo se presentan las etapas tenidas en consideración en el desarrollo del método cromatográfico que permitieron en última instancia la cuantificación de los fármacos en muestras de suero sanguíneo de niños con TC, empleando la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa, acoplada a un detector de arreglo de diodos RP-HPLC-DAD). Para el desarrollo del método se fundamentó en seleccionar los fármacos de interés considerando las quimioterapias vigentes en el país para el tratamiento de la TC congénitas, y considerando que aun cuando la SDZ ha sido ampliamente usada en muchos países, en Colombia poco se comercializa, y es por lo cual, que la SDX se constituye como el medicamento llamado para el tratamiento. Seguidamente de la selección se procedió a realizar el ajuste de las condiciones instrumentales de inicio para lograr una adecuada separación entre los analitos y realizando variaciones en las concentraciones de los fármacos se construyeron las respectivas curvas de calibración que permitieron realizar la cuantificación.*

---



### 3.1. INTRODUCCIÓN

La determinación cuantitativa de fármacos en fluidos corporales de pacientes infectados por el *Toxoplasma gondii*, requieren el suministro terapéutico riguroso de antibióticos como la SDX, SDZ, PYR, al igual, que sus combinaciones entre otros fármacos, sin embargo, hay evidencia de los efectos secundarios severos que pueden ocasionar, concentraciones en  $\mu\text{g/mL}$  elevadas, que se puedan generar por una sobredosificación o un uso muy prolongado, con la posibilidad que puedan afectar drásticamente la salud de los pacientes (68, 74).

De otro lado, la mayoría de los fluidos biológicos, como sangre que se constituye como una matriz de estudio muy compleja, debido a la cantidad inmensa de metabolitos que la constituyen que puedan interferir en la determinación de los fármacos, y que en algún momento se puedan eliminar o mimetizar durante el proceso de adecuación de las muestras sanguíneas, como en la etapa de digestión al eliminar las proteínas (71).

Dichas variables complican poder determinar mediante otro tipo de técnicas convencionales, la presencia y cantidad de antibióticos presentes en una matriz biológica, requiriéndose posiblemente mayor tiempo, más recursos y menos confiabilidad.

Las técnicas cromatográficas como la HPLC, CG y la espectrofotometría, representan procedimientos bioanalíticos adecuados para la cuantificación de medicamentos en matrices biológicas, que permiten análisis rápidos y con alto grado de confiabilidad (71).

Hay muchos métodos cromatográficos reportados, basados en la digestión ácida de las muestras con ácidos como el perclórico y el acético entre otros, que se basan en la extracción líquido-líquido con solventes como el acetonitrilo, la acetona, el diclorometano y el metanol, que seguida por una extracción en fase sólida apolar (SPE), LiChrospher® usando fases estacionarias como Nucleosil-C<sub>18</sub>, WatersSpherisorb ODS2, LiChrospher® o Lichrosorb RP<sub>18</sub> (por sus nombres comerciales) entre otros, constituidos por alúmina y sílica gel con grupos CH<sub>3</sub>,



$C_8H_{17}$  o  $C_{18}H_{37}$ ; esta última correspondiente a un grupo octadecilsililo conocida como  $C_{18}$  que se usa ampliamente en HPLC en fase reversa (75), técnica preferida para la cuantificación de antibióticos en sangre, y la identidad de los residuos apoyado por un acople a un detector UV, o de arreglo de diodos (DAD). Esta técnica brinda alta especificidad y sensibilidad analíticas, y provee información cualitativa como cuantitativa en una prueba única, brindando flexibilidad que permite el diseño de métodos analíticos en relativamente poco tiempo, incluyendo procesos de automatización de los mismos (24, 76).

### 3.2 METODOLOGÍA.

#### 3.2.1 Selección de fármacos (analitos)

En Colombia, al confirmarse el diagnóstico de TC en un recién nacido, independiente de si su madre recibió o no tratamiento, se deben tratar con un esquema de PYR-SDZ/ácido folínico por un año. No obstante otros estudios han presentado otras combinaciones adecuadas para el tratamiento: PYR-SDX, que se consigue en tabletas (55), y es de fácil adquisición a nivel nacional, a excepción de la combinación de PYR-SDZ.

En la Tabla 2, se presentan algunas propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, entre otros aspectos.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los fármacos de estudio.

Antibiótico	P.M. (g/mol)	GRUPO QUÍMICO	P.F. (°C)	SOLUBILIDAD EN AGUA mg/L
Sulfadoxina	310,33	Sulfonamidas	199	Insoluble
Sulfadiazina	250,28	Sulfonamidas	252	Insoluble
Pirimetamina	248,71	Diaminopirimidinas	233,5	Insoluble



### 3.2.2 Condiciones cromatográficas

Los análisis se llevaron a cabo en un equipo HPLC-DAD (Shimadzu, Japón), detector UV-VIS de matrices de fotodiodo Prominence SPD-M20A (operando a 270 nm), un horno Shimadzu CTO-10AS VP, un automuestreador Shimadzu SIL-10AF, un desgasificador Prominence DGU-20<sup>a5</sup>. Se empleó una columna C<sub>18</sub> ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 µm) marca Waters. El software empleado para el análisis de los datos obtenidos fue LC-Solution (Shimadzu).

La técnica analítica empleada fue: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC), fundamentada en el método reportado por Johannessen, *et al*, 2005 (77), para la determinación simultánea de pirimetamina, sulfadiazina y N-acetil sulfadiacina, en plasma por monitoreo de niños con TC. A este procedimiento se le realizó una adecuación y/o adaptación para la determinación de los niveles de otro fármaco empleado ampliamente para tratar la toxoplasmosis, con alto nivel de eficacia como la SDX, e incluso se realizaron varios ensayos de tipo comparativo respecto al sustrato (matriz) para el análisis (suero y plasma), comparación entre tipos de sustratos para la curva patrón (en suero y solo en fase móvil, metanol).

En la Tabla 3, se registra las condiciones cromatográficas establecidas para la determinación de SDX y SDZ por RP-HPLC-DAD.



Tabla 3. Condiciones cromatográficas para la determinación de SDX y SDZ.

<b>Fase Móvil</b>	Fase móvil A: metanol + agua + ácido fórmico concentrado 50:950:1 (v/v/v). Fase móvil B: metanol + agua + ácido fórmico concentrado 500:500:1 (v/v/v)
<b>Columna</b>	columna C <sub>18</sub> ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 µm) marca Water
<b>Detector</b>	detector UV-VIS de matrices de fotodiodo Prominence SPD-M20A
<b>Automuestreador</b>	Shimadzu SIL-10AF
<b>Horno</b>	Shimadzu CTO-10AS VP
<b>Desgasificador</b>	Prominence DGU-20 <sup>®</sup> 5
<b>Software del equipo, para análisis de datos.</b>	LC-Solution (Shimadzu)
<b>Volumen de Inyección</b>	20 µL
<b>Temperatura puerto de Inyección</b>	25-30°C
<b>Flujo de Columna</b>	0.5 mL/min
<b>Presión de análisis.</b>	entre 24.7 y 0.7 MPa
<b>Longitud de onda.</b>	270 nm

\*El sistema cromatográfico HPLC y las columnas fueron aportados por el laboratorio de cromatografía de la Universidad de Caldas.

### 3.2.3 Estándares y reactivos

Para desarrollar la metodología, se empleó estándares de antibióticos (SDX, SDZ), certificados por ORBUS PHARMA LTDA, de Bogotá. D.C.), en estado sólido y con porcentaje de pureza cercano al 100%.

Los solventes utilizados fueron:

Metanol, Calidad HPLC (J.T. Baker).

Ácido fórmico 98% grado analítico marca (Merck).

Ácido perclórico 72% grado analítico marca Merck. (Etapas de extracción)



Tabla 4. Materiales y equipos utilizados en la toma de muestras de suero, almacenamiento y procesamiento.

Centrífuga refrigerada	referencia eppendorf 5430
Sonicador	marca Branson – 2510
Congelador	Marca Samsung.
Balanza analítica	Marca Pioner – OHAUS, 0.0001 g.
Freezer	Marca Samsung
Micropipetas.	10, 100 y 1000 µl
Puntas de micropipetas.	20, 200, y 1000 µL
Tubos eppendorf	1, 5 y 2 ml.
Balones aforados	5, 10, 50, 100 y 250 ml.
Pipetas de vidrio	1, 5 y 10 ml.
Vasos de precipitado	5, 10, 50, 100 y 500 ml.
Probetas de vidrio.	25, 50, 100 y 1000 ml.
Viales	Con tapa para HPLC.
Filtros para HPLC	Marca millex para, de 13mm Ø y 0.22µm, marca ADVANTEC.
Programas de procesamiento de datos.	OriginPro 8 SR0, GraphPad Prism versión 6.03, Plantilla elaborada en Microsoft office Excel 2007 (anexo 3), basado en libro de Harris(78).
Procesador de texto	Microsoft Office Word 2007.
Ordenador	AMD – Athlon.
Agua	Grado HPLC, fue purificada en un sistema Direct-Q (Millipore)

\*Los reactivos de fase móvil, muestras de suero, y demás material de laboratorio fueron suministrados por los laboratorios de biomédicas, la maestría en Química de la Universidad del Quindío, y el laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Caldas.

Las soluciones iniciales de cada antibiótico se prepararon a partir del analito de alta pureza empleando el solvente principal de la fase móvil (metanol grado HPLC), expresando la concentración en µg/mL de solución.

Para calcular la concentración de cada antibiótico en solución individual se tuvo en cuenta el porcentaje de pureza y con base a la cantidad pesada y al volumen de aforo, se calculó la concentración de cada antibiótico según la Ecuación 3.1.

$$\text{Concentración} \left( \frac{\mu\text{g de antibiótico}}{\text{mL de solución}} \right) = \frac{m * \% \text{Pureza}}{V} \quad \text{Ecuación 3.1.}$$

Donde:

$m$  : Masa del analito (antibiótico) (µg)

$V$  : Volumen final de aforo (L)

$\% \text{ Pureza}$  : Porcentaje de pureza del antibiótico.



Partiendo de los cálculos anteriores, se procedió a la preparación de soluciones individuales de los antibióticos a concentraciones más bajas que las establecidas en el método original (100 mg/mL para SDZ), ya que la SDX y la SDZ, presentan baja solubilidad en metanol, e incluso insolubilidad en agua. Por lo cual, fue necesario sonicación de las soluciones para su dilución. Se prepararon soluciones de 624  $\mu\text{g/mL}$  para SDZ y 644  $\mu\text{g/mL}$  para SDX, ambas soluciones en metanol, y a partir de éstas, otras dos soluciones de 516  $\mu\text{g/mL}$  para SDZ y 530  $\mu\text{g/mL}$  para SDX, así como también una mezcla de ambos fármacos de concentración 130  $\mu\text{g/mL}$ .

Con base la ecuación de dilución (ecuación 3.2.), se muestra el procedimiento para la preparación de la solución de SDX de 130  $\mu\text{g/mL}$ :

$$V1 = \frac{C2 \times V2}{C1} \quad \text{Ecuación 3.2.}$$

Donde:

V1= Volumen inicial de solución patrón (mL)

V2 = Volumen final solución de análisis (mL)

C1= Concentración inicial solución patrón ( $\mu\text{g/mL}$ )

C2= Concentración final solución de análisis ( $\mu\text{g/mL}$ )

$$SDX130 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{130 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 5\text{mL de Solución}}{644 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ de Patrón SDX}} = 1.009\text{mL}$$

Este resultado corresponde a uno de los volúmenes que se añadieron para la preparación de la mezcla de antibióticos. De igual forma se prepararon las otras soluciones de análisis mencionadas.

Seguidamente se inyectaron en el equipo por triplicado en el RP-HPLC-DAD a las condiciones anteriormente establecidas para conocer la señal





analítica característica y su tiempo de retención tanto de las soluciones individuales como de la mezcla.

Para establecer la incidencia de la matriz en el método, se procedió a preparar soluciones en matriz suero y plasma sin los antibióticos, y con antibióticos, para comprobar que las señales analíticas corresponden a los fármacos analizados. (Figuras 33 – 36).

### 3.2.4 Curvas de calibración

- **Linealidad del sistema:** Para determinar la linealidad del sistema se procedió a la preparación de una curva de calibración de 7 niveles con las siguientes concentraciones: 120, 50, 30, 10, 5, 1 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , a partir de la dilución de la solución patrón de los fármacos SDZ –SDX (530.4 y 1070  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente). A partir de estas soluciones se prepararon otras de concentración de cada una 120 y 300  $\mu\text{g/mL}$  (anexo 6), de las cuales, se procedió a preparar los estándares de la curva. Las determinaciones se realizaron por separado y luego se promedió la señal analítica del equipo correspondiente al área del pico cromatográfico para cada fármaco.

Con esta curva de calibración se pretendió evaluar un amplio rango de concentración, desde uno muy bajo, hasta un nivel relativamente alto, donde se considera en gran medida que las concentraciones sanguíneas puedan estar luego de dosis terapéuticas de la combinación Pirimetamina-Sulfadoxina (PYR-SDX), y poder ser determinadas con el método propuesto. Los datos de preparación de las curvas se muestran en las Tablas 5 y 6.



Tabla 5. Elaboración curva patrón SDX-SDZ de 120 (ug/ml).

Vial Nº.	[ ] estándar SDZ-SDX (ug/ml). C-2.	V. Final estándar (mL). V-2	[ ] Patrón 1 SDZ-SDX 120 (ug/ml). C-1	V. inicial patrón 1 (mL). V-1
1	0.5	10	120	0.042
2	1	10	120	0.834
4	5	10	120	0.4167
5	30	10	120	2.5
6	50	10	120	4.17
7	120	10	120	10

Tabla 6. Elaboración curva patrón SDX-SDZ de 300 (ug/ml).

Vial Nº.	[ ] estándar SDZ-SDX (ug/ml). C-2.	V. Final estándar (mL). V-2	[ ] Patrón 2 SDZ-SDX 300 (ug/ml). C-1	V. inicial patrón 2 (mL). V-1
1	0.5	10	300	0,016
2	1	10	300	0,033
4	5	10	300	0,16
5	30	10	300	1
6	50	10	300	1,66
7	120	10	300	4

- **Linealidad del método:** De acuerdo con los resultados de la linealidad del sistema se procedió a realizar una curva con 7 niveles de calibración en matriz suero, desde el estándar de menor concentración 0,2 µg/mL tanto para SDX y SDZ hasta un nivel máximo de 50 µg/mL. Mejor rango de linealidad observado. Estos estándares fueron analizados bajo las mismas condiciones de preparación de las muestras. La preparación de la curva se muestra en la tabla 7.



3.2.4.1 Curva de Calibración Estándar en Suero: Se prepararon dos soluciones stock: la primera de SDZ de 624 µg/mL, y la segunda de SDX de 644 µg/mL, luego se prepararon otras dos soluciones a partir de éstas, una de 50 µg/mL y otra de 20 µg/mL respectivamente. Seguidamente se llenó la tabla para calcular los diferentes volúmenes a tomar de cada solución.

Tabla 7. Curva patrón del método en matriz suero.

Nivel Nº.	[ ] final Estándar (ug/mL). C-2.	V. final de análisis. (uL) V-2	V. de HClO <sub>4</sub> (5%)	V. de suero.	[ ] inicial de SDZ. (ug/mL). C-1	V. inicial de SDZ624 y 50 (mg/mL). V-1	[ ] inicial de SDX. (ug/mL). C-1	V. inicial de SDX-644 y 20 (ug/mL) V-1	V. metanol aforo (uL).
1	0.2	1400	400	500	50	5.6	20	14	480
2	0.5	1400	400	500	50	14	20	35	451
3	1	1400	400	500	50	28	20	70	402
4	2	1400	400	500	50	56	20	140	304
5	5	1400	400	500	50	140	20	350	10
6	30	1400	400	500	624	67,31	644	65.2	367,5
7	50	1400	400	500	624	112	644	108.7	391,3

\* Se aclara que se adicionaron por separado los estándares a la solución, para la curva patrón inicial en suero.

3.2.4.2 Curva de calibración estándar en metanol: Esta curva se construyó de manera similar a la curva correspondiente para probar la linealidad del sistema, con la diferencia que los estándares se procesaron bajo idénticas condiciones que la curva patrón en suero, con la finalidad de analizar la señal analítica, en las condiciones descritas.



Tabla 8. Preparación curva de calibración estándar en metanol (Fase móvil) grado HPLC.

Nivel Nº.	[ ] final Estándar (µg/mL). C-2.	V. final de análisis. (µL) V-2	V. de HClO <sub>4</sub> ( 5%)	[ ] inicial de SDZ (µg/mL) C-1	V. inicial de SDZ-624 y 50 µg/mL. V-1	[ ] inicial de SDX (µg/mL). C-1	V. inicial de SDX-644 y 20 (µg/mL) V-1	V. metanol aforo. (uL)
1	0.2	1400	400	50	5.6	20	14	980,4
2	0.5	1400	400	50	14	20	35	951,0
3	1.0	1400	400	50	28	20	70	902,0
4	2.0	1400	400	50	56	20	140	804,0
5	5.0	1400	400	50	140	20	350	510,0
6	50	1400	400	624	112.	644	108,7	789,2

\*Esta curva se preparó de manera similar a la curva en suero.

3.2.4.3 Curva de calibración estándar en plasma: Esta curva se construyó con la finalidad de observar variaciones en la señal analítica cuando se emplea otra matriz sangre como el plasma.

Tabla 9. Preparación curva calibración estándar en plasma.

Nivel Nº	[ ] final Estándar (µg/mL). C-2.	V. final de análisis. (uL) V-2	V. de HClO <sub>4</sub> (5%)	V. de Plasma	[ ] inicial mezcla patrón de SDZ y SDX (µg/mL). C-1	V. inicial mezcla estándar de SDZ-SDX (uL). V-1	V. metanol aforo (uL).
1	0.2	1400	400	500	10	28,0	472
2	2.0	1400	400	500	10	280,0	220
3	10.0	1400	400	500	200	70,0	430
4	20.0	1400	400	500	200	140,0	360
5	50.0	1400	400	500	200	350,0	150

\*En la preparación de esta curva, el estándar se preparó conjuntamente en una sola solución, de dos concentraciones diferentes (10 µg/mL y 200 µg/mL).

#### 3.2.4.4 Curva de calibración PYR-SDX en suero:

Teniendo en consideración que el tratamiento terapéutico suministrado a los niños con TC, consistió en dosis de la combinación SDX-PYR, en concentraciones de 500 y 25 mg respectivamente, se analizó la respuesta



analítica del fármaco comercial frente a un estándar de alta pureza, y se observó algún tipo de variación.

Tabla 10. Preparación Curva de Calibración en Suero con PYR-SDX (similar curva patrón estándar).

Nivel N°.	[ ] final Estándar (µg/mL).	V. final de análisis. (uL)	V. de HClO <sub>4</sub> (5%)	V. de Suero	[ ] estándar de (SDX – PYR) (µg/mL).	V. inicial estándar r (SDX – PYR) 250 (µg/mL). V-1	V. metanol aforo (µL).
	C-2.	V-2			C-1		
1	0.2	1400	400	500	250	1.12	498.90
2	0.5	1400	400	500	250	2.8	497.2
3	30.0	1400	400	500	250	168	332
4	50.0	1400	400	500	250	280	220

### 3.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.3.1 Análisis cualitativo

Las soluciones stock de SDZ y SDX, se sonicaron en un equipo Branson-2510, a una temperatura entre 36 y 37 °C, durante 5 min. Las sulfas son fácilmente separadas por RP-HPLC-DAD, sin embargo, bajo las condiciones establecidas para las dos fases móviles, se presentaron inconvenientes para la separación cromatográfica de los fármacos, incluido inicialmente la pirimetamina (PYR), la cual, luego de optimizar las condiciones de separación de las sulfas (SDZ y SDX), no fue posible mejorar las condiciones para determinar la PYR. Por tal motivo, no fue tenido en consideración para su análisis en el presente trabajo. Dicha separación se muestra en la Figura 26.

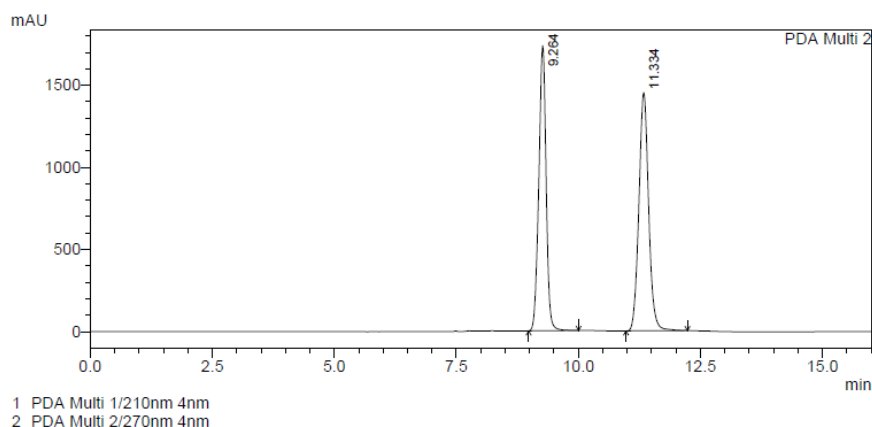


Figura 26. Cromatograma de una solución de suero control positivo con soluciones de 300 µg/mL de SDX, 200 µg/mL de SDZ, y 200 µg/mL de PYR.

En el cromatograma de la Figura 26, se observan los picos correspondientes a la SDZ y SDX, pero no de la PYR, lo que posiblemente indica que este pico sale a un tiempo de retención muy próximo del correspondiente a la SDX, y se enmascara o solapa, y bajo las condiciones de trabajo no permiten que sea detectado.

Tabla 11. Comparación de los tiempos de retención de los antibióticos en solución individual y en la mezcla.

ESTANDAR	MATRIZ	t <sub>r</sub> (min) individual	t <sub>r</sub> (min) en la mezcla
Sulfadiazina (SDZ)	Metanol	9,341	9,451
	Suero		9,330
	Plasma		9,418
Sulfadoxina (SDX)	Metanol	11,599	11,658
	Suero		11,528
	Plasma		11,631
Falcidar (PYR-SDX)	Metanol	*11.503	
	Suero	*11,495	
	Plasma	*11,550	



Los  $t_r$  de los analitos no se ven afectados luego de realizar la mezcla, ya que los  $t_r$  no están cercanos entre sí, por tanto, no se presenta solapamiento o interferencia en la señal, lo cual, facilita el análisis. Por consiguiente, es posible cuantificar los antibióticos en un mismo análisis cromatográfico, reduciendo costos y tiempo de trabajo. De igual manera, el  $t_r$  del medicamento Falcidar, que es una mezcla de dos fármacos, donde uno de ellos no fue posible bajo las condiciones de análisis poderse separar y cuantificar, presenta una señal analítica bien definida en un  $t_r$  similar al fármaco SDX de la solución estándar, confirmando la presencia de SDX tanto en la solución, como en las tabletas comerciales de Falcidar.

Después de confirmada la identidad de los fármacos, se construyeron las curvas de calibración para cada uno de ellos, en las diferentes matrices analizadas, tanto para el análisis de linealidad del sistema como del método.

Se manejaron diferentes niveles en las curvas como se evidencian en cada una de las tablas anteriores (5-10). En las curvas que fue posible se inyectaron por duplicado o triplicado, y con las áreas obtenidas se estimó la media, la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), como se registra en las Tablas 12 y 13. Cabe mencionar que la variación en el número de réplicas obedeció a las limitaciones locales de disponibilidad de reactivos y equipos.

El %RSD se calcula mediante la ecuación 3.3:

$$\%RSD = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Área promedio}} * 100 \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Linealidad del sistema (metanol): Con la intención de evaluar la variabilidad en el sistema (la bomba, el detector, columna, etc), en la determinación del intervalo de concentraciones donde el sistema cumple la Ley de Beer, o el intervalo óptimo de concentraciones donde se evidencie en el equipo una señal analítica proporcional lineal, se procedió a preparar 7 niveles de estándares de



calibración en metanol, a partir de dos patrones de referencia de SDX y SDZ, de preparación diferente a las soluciones para la implementación del método, las cuales, no recibieron un tratamiento similar, que el recibido por los estándares para construir la curva patrón, y las muestras reales, considerando que ambos estaban en matriz suero, y poder evaluar su incidencia en el proceso de extracción de la muestra.

- Se inyectó una vez cada estándar de los dos patrones y se promedió el valor de la señal, para determinar la relación de dependencia entre el área media del pico cromatográfico y la concentración de los estándares, determinando para ello: la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación; usando el método estadístico de mínimos cuadrados.

Resulta importante mencionar que de las tres maneras de verificar un intervalo de concentraciones, para el cual, el modelo lineal es válido, ninguna de ellas es excluyente de las otras: a) investigación del gráfico de residuos ( $y - \hat{y}$ ) en función de la concentración (homocedasticidad), b) verificación de la validez del modelo lineal mediante el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), y c) análisis de varianza de la regresión(79).

Para la estimación del numeral (c) se procedió a determinar el test de proporcionalidad (*t-Student* para el intercepto), la pendiente y la regresión, para comparar el  $t_{exp}$  con el  $t_{cal}$  en un nivel de confianza del 95%, donde un  $t_{exp} > t_{cal}$  indica claramente una correlación significativa entre el área del pico y la concentración del analito. Igualmente se realizó la prueba (*F-Snedecor*), para calcular la igualdad entre varianzas (80) (Anexo 3).





Tabla 12. Áreas obtenidas del patrón sulfadiazina para la linealidad del sistema.

SULFADIAZINA (SDZ)– LINEALIDAD DEL SISTEMA.						
Nivel	[ ] en (µg/mL)	Área-1	Área-2	Media	SD	%RSD
1	0,5	73364	52360	62862	14852,07	19,88
2	1	116523	123949	120236	5250,97	3,62
3	5	649031	316234	482632,5	235323,02	48,96
4	10	1467661	2520778	1994219,5	744666,17	38,84
5	30	4429106	4079225	4254165,5	247403,23	6,45
6	50	10114695	6872123	8493409	2292844,65	29,48
7	120	17909623	17261007	17585315	458640,77	2,78

Tabla 13. Áreas obtenidas del patrón sulfadoxina para la linealidad del sistema.

SULFADOXINA – LINEALIDAD DEL SISTEMA.						
Nivel	[ ] en (µg/mL)	Área-1	Área-2	Media	SD	%RSD
1	0,5	86853	62540	74696,5	17191,89	23,02
2	1	129977	160046	145011,5	21261,99	14,67
3	5	579577	381794	480685,5	139853,70	29,09
4	10	1334516	2500208	1917362	824268,72	42,99
5	30	3819439	3855412	3837425,5	25436,75	0,66
6	50	8956182	6596526	7776354	25436,75	0,32
7	120	16772189	16266813	16519501	357354,79	2,16

Posteriormente se determinó la pendiente (ecuación 3.4), el punto de corte (ecuación 3.5) y el coeficiente de correlación (ecuación 3.6), por el método de mínimos cuadrados.

$$\text{Pendiente (b)} \quad b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuacion 3.4}$$

$$\text{Punto de corte (a)} \quad a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Ecuación 3.5}$$



$$\text{Coeficiente de correlación } r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \quad \text{Ecuacion 3.6}$$

De donde  $(x_i)$  es cada dato de la concentración,  $\bar{x}$  es el promedio de las concentraciones,  $y_i$  valor del promedio de las áreas, y  $\bar{y}$  es el promedio de las áreas promedio.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{Ecuación 3.7.}$$

Con la ecuacion (3.7), se calcula la prueba de significancia ( $t$ ), que es adecuada para la comparación de los resultados calculados a partir de las medias aritmeticas, donde se toma como  $H_0$  (hipótesis nula) de que no hay correlación entre X y Y, rechazandose  $H_0$  si  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ . El  $t_{\text{crítico}}$  se lee con  $(n-1)$  grados de libertad, prueba de dos colas y el 95% de confiabilidad, donde  $(n)$  es el número de datos (puntos en la curva).

$$t_{\text{crítico}} = (n - 1, P = 0,05) = 2447; n = 7 \quad \text{Ecuación 3.8.}$$

La determinación de los valores correspondientes a la pendiente y al punto de corte, se reportan a través las ecuaciones 3.9.y3.10.

$$b \pm t(n - 2)S_b \quad \text{Ecuación 3.9}$$

$$a \pm t(n - 2)S_a \quad \text{Ecuación 3.10}$$

De estas ecuaciones  $t$  es el crítico y  $s$  es la desviación estándar de la pendiente (ecuación 3.4.) y el punto de corte (ecuación 3.5.), respectivamente.



$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 3.11.

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 3.12.

En estas ecuaciones la expresión  $s_{y/x}$  (ecuación 3.13.), corresponde al error aleatorio en la dirección  $y$ , y se calcula allí porque la mayor dispersión tomada para el análisis de cualquier par de datos recae en el eje  $y$  (variable dependiente).

Error aleatorio en ( $y$ ).

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Ecuación 3.13.

En (ecuación 3.13), el  $\hat{y}_i$  corresponde al área ajustada, que se lee sobre la gráfica con cada valor de  $X$  (concentración).

Por otro lado igualmente se calcularon los límites de detección (ecuación 3.14.) y decuantificación (ecuación 3.15.) para poder proporcionar exactitud en las medidas analíticas. Este procedimiento se realizó determinando el área promedio de la señal del ruido del blanco multiplicado por 4, para el límite de detección, y multiplicando por 16 para el límite de cuantificación.

$$\text{Límite de detección (LOD)} = 4 \text{ NS} \quad \text{Ecuación 3.14.}$$

$$\text{Límite de cuantificación (LQ)} = 16 * \text{NS} \quad \text{Ecuación 3.15.}$$



A través de las ecuaciones 3.14 y 3.15 se puede determinar respectivamente, la cantidad mínima detectable que indica la existencia del analito pero para los cuales su determinación cuantitativa no es válida, y la cantidad mínima cuantificable para predecir la concentración de la muestra.

- Linealidad del método (suero): La linealidad de la respuesta analítica se determinó preparando 7 niveles de estándares de calibración (región de mayor linealidad gráfica), a partir de los patrones de referencia con las siguientes concentraciones: 50, 30, 5, 2, 1, 0.5, y 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , para ambos fármacos (SDZ y SDX), en matriz suero, inyectando cada uno de ellos por duplicado, al sistema HPLC, y se procedió a determinar la relación de dependencia entre el área media del pico cromatográfico y la concentración de los estándares a través de la determinación de parámetros similares que los mencionados para la determinación de la linealidad del sistema.

En la tabla 14 se reporta las áreas obtenidas para las concentraciones y la media aritmética calculada de los datos.

Tabla 14. Áreas obtenidas del patrón sulfadiazina para las curvas de calibración.

SULFADIAZINA						
Nivel	[ ] en ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área-1	Área-2	Media	SD	%RSD
1	0,2	85930	55656	70793	21406,95	30,24
2	0,5	105626	97568	101597	5697,87	5,61
3	1	247518	248254	247886	520,43	0,21
4	2	464886	461915	463400,5	2100,81	0,45
5	5	1270344	1271269	1270806,5	654,07	0,05
6	30	7572169	7578400	7575284,5	4405,98	0,06
7	50	13182226	13115713	13148969,5	47031,79	0,36

Con 14 datos, 7 grupos y dos series. (Anexo 1)



Tabla 15. Áreas obtenidas del patrón sulfadoxina para las curvas de calibración.

SULFADOXINA						
Nivel	[ ] en ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área-1	Área-2	Media	SD	%RSD
1	0,2	182999	89186	136092.8	66335,81	48,74
2	0,5	131734	140722	136227.9	6355,48	4,67
3	1	236565	237114	236839.5	388,20	0,16
4	2	451158	423493	437325.4	19562,11	4,47
5	5	913446	914157	913801.6	502,75	0,06
6	30	6601460	6615340	6608400.1	9814,64	0,15
7	50	11562666	11528196	11545430.6	24373,97	0,21

Con 14 datos, 7 grupos y dos series. (Anexo 2)

La desviación estándar relativa (%RSD) o coeficiente de variación (%CV), posibilitan la evaluación de la incertidumbre en la estimación de la media, que corresponde al error aleatorio que atañe a la dispersión de los datos alrededor de la media, que para el caso de la determinación de una droga en fluidos biológicos no es posible alcanzar precisiones altas, por lo que se contemplan valores entre el 5 al 10% o incluso valores mayores (70).

Con base en los datos obtenidos correspondientes para las áreas de los antibióticos en los niveles de calibración de las curvas, muchos de los resultados obtenidos tienen %CV inferiores del 5%, principalmente en los valores de las curvas patrón para el método, a diferencia de los obtenidos para la curva de calibración del sistema, donde se evidencian valores superiores, sin embargo, esto posiblemente se deba al procedimiento de preparación de los estándares, que no obstante muestran resultados que validan una linealidad en la respuesta del equipo, que se apoyan en el análisis de varianza que indica un alto nivel de significancia en la correlación.

Por otro lado, se construyeron curvas de calibración estándar por el método de mínimos cuadrados simple, con los datos de las lecturas, los cuales, en el caso de la curva para la linealidad del sistema se construyeron dos curvas independientes, se midieron y luego se promediaron los resultados, para las curvas del método, se midieron por duplicado y se promediaron los resultados obtenidos. Las curvas de calibración responden a un modelo lineal ( $y = bx + a$ ),

donde la variable independiente  $x$ , corresponde a la concentración en ( $\mu\text{g/mL}$ ), y la variable dependiente equivale al área. Los términos  $a$  y  $b$ , representan los estimadores de la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente.

Luego de la construcción de las tablas 12-15 y de las curvas de calibración se procedió a obtener las correspondientes curvas para cada fármaco, para verificar la linealidad del sistema se empleó la SDX, y para el método los fármacos SDZ y SDX, donde se representan las rectas obtenidas con las áreas vs concentración; y con el color negro la línea de tendencia central de la Figuras 27 a la 30.

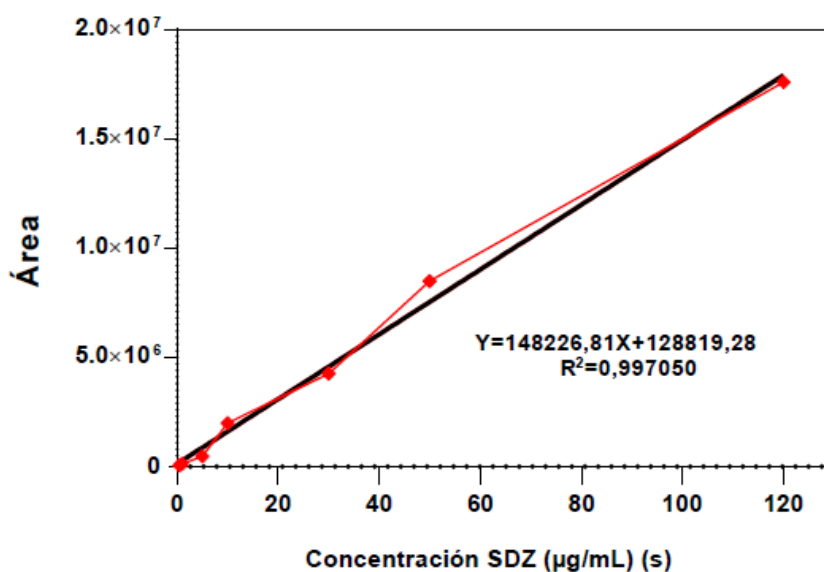


Figura 27. Curva de calibración sulfadiazina (Linealidad del sistema).

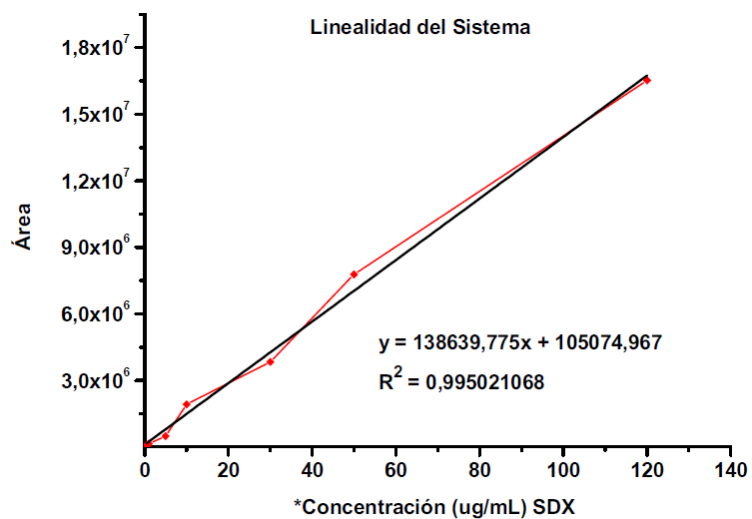


Figura 28. Curva de calibración sulfadoxina (Linealidad del sistema).

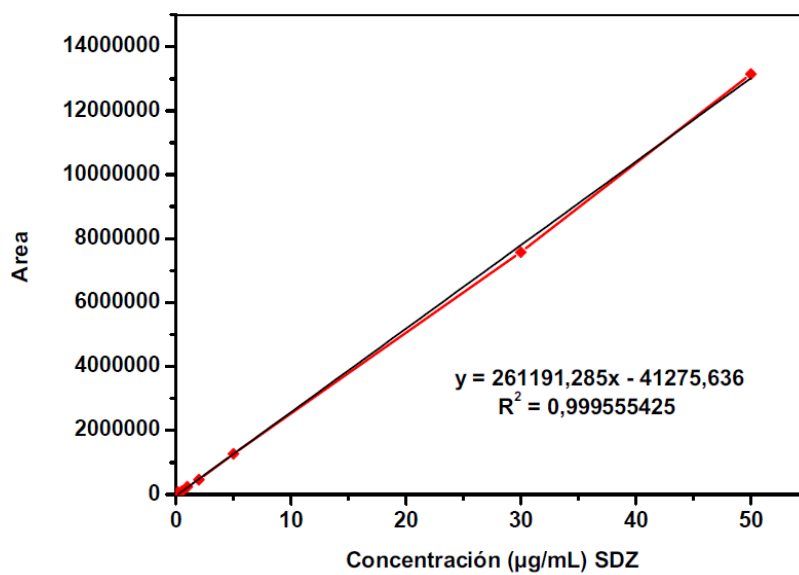


Figura 29. Curva de calibración para sulfadiazina (Linealidad método).

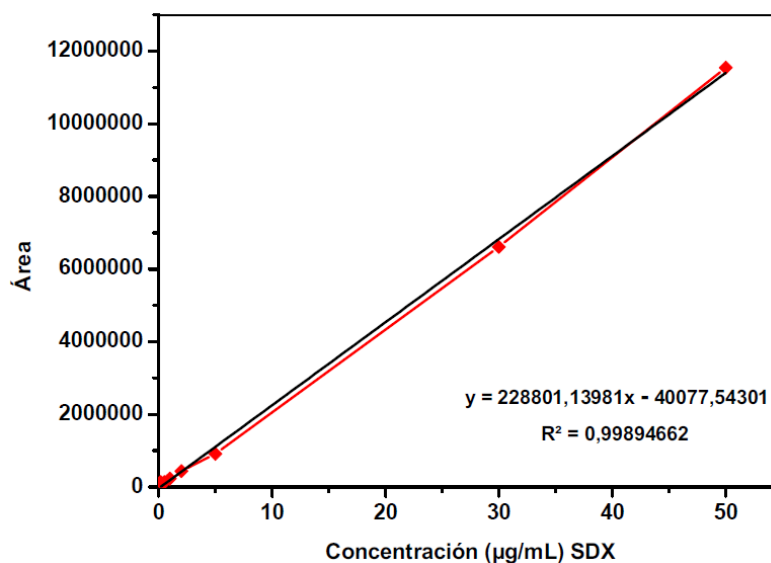


Figura 30. Curva de calibración para sulfadoxina (Linealidad del sistema).

A través de la recta de calibración es posible relacionar la respuesta instrumental con la concentración de un analito. Un indicador importante del grado de correlación es el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) que se obtuvo para cada una de las curvas de calibración, que permitió evidenciar una fuerte correlación entre la concentración del fármaco y el promedio de las áreas (señal del instrumento). Si consideramos que valores superiores a 0.99 establecen un alto grado de ajuste de los puntos experimentales a la recta de calibración y por tanto, una alta correlación entre las variables analizadas, y se constituye en criterio de aceptación de la linealidad (80). En el próximo capítulo se muestra con mayor detalle los atributos de calidad de la metodología establecida.

### 3.4 CONCLUSIONES

La metodología desarrollada e implementada de RP-HPLC-DAD, para la detección y cuantificación de los fármacos SDZ y SDX, resultó ser adecuada bajo las condiciones cromatográficas establecidas, evidenciándose una fuerte respuesta lineal de la señal analítica y la concentración del fármaco en la matriz de estudio. Lo que se confirmó con valores del coeficiente de correlación superiores a 0,99.





Las gráficas obtenidas igualmente permiten una evaluación visual que evidencia un comportamiento proporcional, que se confirma con valores del %CV inferiores a los límites establecidos para bioanálisis (71) de las curvas estándar para la linealidad del método, presentándose valores superiores en algunos datos de la curva de linealidad del sistema.



## CAPÍTULO 4

### VERIFICACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR RP-HPLC CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS (DAD) PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN SUERO Y PLASMA SANGUÍNEO

---

*En este capítulo se describe el proceso de verificación del método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos DAD), que incluye la determinación de los atributos de calidad como la linealidad, precisión, exactitud, selectividad, límite de detección y límite de cuantificación del método, considerando el tratamiento estadístico de los datos, así como los criterios de aceptación empleados.*

*Estos atributos permiten determinar el grado de seguridad que ofrece la metodología empleada a las condiciones descritas en el capítulo anterior, en cuanto a la obtención de resultados precisos y exactos a partir de las muestras de suero y plasma sanguíneos.*

---



## 4.1 INTRODUCCIÓN

Para la determinación cuantitativa de fármacos en una matriz compleja como la sangre, es necesario desarrollar una metodología capaz de eliminar la mayor cantidad de sustancias presentes en la matriz que interfieran e interactúen con los metabolitos de interés sin que éstos sean eliminados en alguna de las diferentes etapas desde la adecuación de la muestra cuando requiera almacenamiento prolongado, pasando por la extracción o finalmente en la purificación. La cromatografía presenta la ventaja de hacer posible y de manera simultánea la determinación de varios analitos, pero con el acondicionamiento de parámetros de calidad como la exactitud, linealidad, selectividad y sensibilidad permitan demostrar que el método ofrece confianza y seguridad en los resultados. Si esto se cumple, se disminuirán el número de fallos y repeticiones analíticas (70), reduciendo los costos que esto conlleva, así como los tiempos de análisis.

Una vez se desarrolle un método de análisis (RP-HPLC-DAD), al igual que toda una técnica analítica, se deberá validar o verificar dicho método, es decir, que a través de la confirmación y documentación de que los resultados obtenidos por él son confiables.

Es claro, como se mencionó anteriormente para la verificación de la fiabilidad y reproducibilidad de un método bioanalítico, donde se emplean matrices biológicas como sangre, plasma, suero, u orina, resulta fundamental la determinación de parámetros como:

Linealidad

Precisión

Exactitud

Sensibilidad (Límites de detección y cuantificación)

Selectividad

Estabilidad



## 4.2 METODOLOGÍA

### 4.2.1 Linealidad

Para evaluar la linealidad se elaboró una curva de calibración para cada fármaco con sus correspondientes coeficientes de correlación ( $r$ ). No obstante, la obtención de una representación gráfica lineal, con un ( $r$ ) superior de 0,99, no garantiza dicho comportamiento, y para ello se realiza una comprobación estadística como el *test t de Student*.

De igual manera existe otro parámetro estadístico para evaluar la linealidad del método como es la homocedasticidad, que consiste en evaluar gráficamente los residuos (diferencia entre la respuesta medida en cada punto de la curva y la calculada a partir de la ecuación de la curva) en función de la concentración(69). Igualmente se debe considerar que para estudios de bioanálisis la curva patrón debe ser preparada en la misma matriz biológica, así como también, las muestras destinadas al estudio de adición de una concentración conocida de analito, y debe cumplir con un ( $r$ ) superior de 0.95(81); lo que posiblemente explique este valor más bajo, sea la complejidad de la matriz y las múltiples interacciones que en ella puedan generarse, y que son difícilmente determinables.

### 4.2.2 Precisión

En la evaluación de este atributo de calidad, que se puede dividir en varios niveles, se consideraron los siguientes parámetros:

- a. Repetibilidad: expresada matemáticamente por el Coeficiente de Variación (%CV) o %RSD de las medidas tomadas. Este parámetro estadístico fue evaluado en dos campos:
  - Repetibilidad instrumental: Para su evaluación se tomaron los estándares empleados en la curva de calibración en los niveles bajo, medio y alto de concentración con el fin de evaluar la repetibilidad del sistema respecto a las concentraciones de trabajo. Posteriormente se analizó su %RSD.

- Repetibilidad del método: En la evaluación de la repetibilidad del método resulta necesario analizar todo el procedimiento, es decir, desde la recolección de las muestras, hasta el análisis instrumental del analito (fármaco), con la finalidad de considerar la imprecisión que pueda producirse a causa de cada una de las etapas del proceso metodológico (70).

En la literatura se encuentran publicaciones para la determinación de sulfonamidas, y en particular las consideradas en el presente trabajo, sin embargo, se tuvo en consideración el método de extracción y análisis publicado en el *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, por *Johannessen et al, 2005 (77)*, debido a que se requiere relativamente poca muestra, la fase móvil es fácil de obtener, ya que solo requiere metanol y agua, con una mínima cantidad de ácido fórmico.

La metodología para la extracción y purificación de los fármacos en sangre se muestra en la Figura 31.

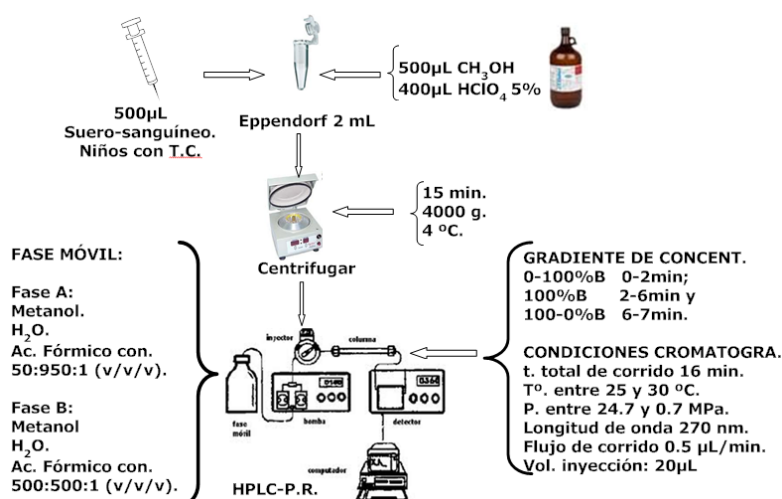


Figura 31. Procedimiento para la extracción y purificación de antibióticos.

Para evaluar la repetibilidad del método se tomaron muestras de blanco (matriz suero) y se prepararon cinco niveles de concentración con la solución estándar. Seguidamente, se inyectaron las muestras al instrumento, al igual, que las



soluciones estándar para verificar la señal analítica, y posteriormente calcular el porcentaje de recuperación del método, empleando la ecuación 4.1.

$$\%R = \frac{X_m}{\mu} * 100 \quad \text{Ecuación 4.1.}$$

Donde  $\mu$  es el valor aceptado como verdadero y  $X_m$  es el valor medio hallado. De igual manera que en la repetibilidad instrumental, la evaluación se realizó con el %RSD de las señales instrumentales obtenidas (áreas).

Para evaluar la reproducibilidad, se prepararon e inyectaron muestras reales tratadas con Falcidar (PYR-SDX), en el rango de linealidad del método en dos días diferentes de análisis, analizando específicamente la sulfadoxina, en niveles únicos de cada muestra, pero diferentes entre sí, cubriendo desde un nivel bajo hasta uno alto de la curva de calibración. Para expresar el resultado se emplea el mismo parámetro matemático que la repetibilidad.

#### **4.2.3 Selectividad.**

El procedimiento empleado fue realizar inicialmente un barrido en todo el espectro UV, para determinar a qué longitud de onda se evidenciaba la mayor señal analítica, la cual, se determinó a 270 nm. Seguidamente se verificó la selectividad del método, aplicando el procedimiento de extracción y purificación a una matriz suero y otra de plasma sin fármacos; al igual, que a los reactivos utilizados durante el análisis. Por otro lado, se dopó la matriz suero y plasma con los fármacos de estudio. Luego se inyectaron individualmente todas las muestras, y los cromatogramas obtenidos de las muestras sin fármacos se compararon con los correspondientes a las muestras dopadas, para verificar la ausencia de solapamiento entre los fármacos y los componentes de la matriz.

#### 4.2.4 Exactitud.

Para evaluar la exactitud del método se procedió según el numeral 4.2.2 Precisión (repetibilidad del método), calculando, el porcentaje de recuperación de cada fármaco a partir de 5 muestras de la matriz. En la determinación de fármacos en sangre, resulta importante tener un estimativo de la exactitud, para tener un valor lo más real posible del nivel de fármacos durante un tratamiento, y con base en los datos obtenidos, se procedió a utilizar la prueba *t de Student*, considerando cinco niveles de concentración comprendidos en el rango de linealidad del método, preparado por duplicado; procedimiento aproximado a lo establecido por *Quatrochi, et al.* (70)

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{Ecuacion 4.2.}$$

Donde *r* es el coeficiente de correlación entre las variables, *n* el número de muestras analizadas,  $y(r^2)$  es el coeficiente de determinación o la varianza (su determinación se muestra más adelante). Luego se calculó el  $t_{\text{experimental}}$  o  $t_{\text{calculado}}$ , que comparado con el *t* de las tablas (anexo 4) para *n*-1 grados de libertad en el nivel de confianza de referencia ( $\alpha = 0,05$ ). Luego se evaluó si el  $t_{\text{calculado}}$  resultaba mayor que el  $t_{\text{tabulado}}$ , lo que indicaría que habría una correlación proporcional significativa entre el valor aceptado como real, y el valor estimado de recuperación, indicando probablemente exactitud aceptable del método establecido.

De igual manera, se procedió a utilizar la prueba de significancia *F (Fisher)* para la regresión (igual prueba se utilizó para los análisis de linealidad del sistema y del método), útil para intentar medir el ajuste de la recta de regresión con el conjunto de datos provenientes de la muestra. Primero se consideró las fuentes de comparación, para nuestro caso en primer lugar la regresión (equivalente a la ecuación de mínimos cuadrados) por su dispersión entre valores de concentración y área, y el error entre cada dato y el estimado, posibilitando el



rechazo de la hipótesis nula, indicando la existencia de una pendiente, en otras palabras, que una porción grande y significativa de  $y$ , se explica por la regresión sobre  $x$ , cuando  $F_{\text{calculado}}$  es mayor que el  $F_{\text{tabulado}}$  (82).

Los grados de libertad se calcularon de la siguiente forma: De la regresión como la cantidad total de ecuaciones que se comparan o grafican, del total como el número de datos menos los grados de libertad de la regresión, y del error como los grados de libertad totales menos los grados de libertad de la regresión.

Tal análisis, se conoce como un “Análisis de Varianza” para una regresión lineal simple, que aprovechando valores calculados en el análisis de regresión (matriz Excel), se puede calcular fácilmente la ecuación básica del análisis de varianza (ecuación 4.3.):

$$\sum(y_i - \bar{y})^2 = \sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum(y_i - \hat{y}_i)^2 \quad \text{Ecuación 4.3.}$$

Donde cada término corresponde respectivamente a:

Suma de cuadrados total:  $SCT = \sum(y_i - \bar{y})^2$

Suma de cuadrados de la regresión:  $SCR = \sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2$

Suma de cuadrados del error:  $SCE = \sum(y_i - \hat{y}_i)^2$

La expresión matemática para calcular el valor experimental de  $F$ , es la siguiente:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{\left(\frac{SCR}{1}\right)}{\left(\frac{SCE}{n-2}\right)}, \text{ o lo que es igual: } \frac{MCReg}{MCE}$$

Esta ecuación representa cada una de las particiones de la regresión, y se asocia a una porción correspondiente del total de grados de libertad, como se presenta en la Tabla 16:



Tabla 16. Análisis de varianza

TABLA ANOVA				
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados medios(MC)	$F_{\text{calculado}}$
Regresión	$SCR = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	1	$MCReg$	$\frac{MCReg}{MCE}$
Error Residual	$SCE = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - 2$	$MCE = \frac{SCE}{n - 2}$	
Total	$SCT = \sum (y_i - \bar{y})^2$	$n - 1$	$MCT = \frac{SCT}{n - 1}$	

De la tabla anterior, se pueden relacionar entre si dos parámetros, para el cálculo del coeficiente de determinación ( $r^2$ ), que puede interpretarse como una medida de la bondad de ajuste de la recta estimada a los datos reales. Dicho parámetro que en porcentaje, se puede explicar como el porcentaje de la variabilidad total de "y" que puede atribuirse al aplicar la ecuación de regresión.

$$r^2 = 1 - \left( \frac{SCE}{SCT} \right)$$

#### 4.2.5 Sensibilidad

Este parámetro fue evaluado determinando los límites de detección y cuantificación que normalmente presentan unidades de concentración, y se calcularon de dos formas diferentes:

Primero, a partir de las curvas de calibración de cada fármaco, tanto para el sistema como para el método, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Se obtuvo la curva de calibración con todos los niveles empleados en la calibración.

Se extrapoló en la curva a concentración cero, obteniéndose un estimado o valor aproximado de la señal analítica del blanco, es decir, el intercepto en  $y(a)$ .

Se estimó la desviación estándar del intercepto  $S_b$ , o sea, el error aleatorio en la dirección (y), es decir,  $S_x^y$ .



Con los datos anteriores se calculó LD y LQ, con base en las fórmulas siguientes (80):

$$(\text{Límite de detección})LD = a + 3 * S \frac{y}{x} \quad \text{Ecuación 4.4.}$$

$$(\text{Límite de detección})LD = a + 10.0 * S \frac{y}{x} \quad \text{Ecuación 4.5.}$$

Segundo, de forma gráfica, calculando el área promedio de la señal del ruido en el blanco (matriz suero), usando las ecuaciones siguientes:

$$(\text{Límite de detección})LD = 4 * NS. \quad \text{Ecuación} \quad 4.6.$$

$$(\text{Límite de Cuantificación})LQ = 10 * NS. \quad \text{Ecuación} \quad 4.7.$$

Donde NS, corresponde a la señal promedio del ruido en el blanco.

## 4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.3.1 Linealidad

Luego de preparar los estándares y ser inyectados en el equipo de HPLC, se procedió a construir las curvas de calibración, que se muestran en el capítulo 3.

Luego de verificar un valor aceptable considerando el Coeficiente de Correlación( $r$ )>0,99, se construyó la curva de calibración, la cual, permitirá determinar la concentración de las muestras problema mediante interpolación, además, es empleada para la estimación del límite de detección de la metodología analítica. Sin embargo es importante considerar los errores aleatorios en los valores de la ordenada en el origen y la pendiente, asociada a su desviación estándar. Por lo cual, calculando las desviaciones estándar de la ordenada en el origen( $a$ ), y de la pendiente ( $b$ ), se puede determinar los límites de confianza, es decir, los intervalos entre los cuales se espera que se encuentre el valor de la ordenada en el origen y de la pendiente. Para su determinación, se emplea las ecuaciones 4.8 y 4.9, donde el valor de  $t$ , se



obtiene para un nivel de confianza del 95% correspondiendo a un  $\alpha=0,05$  y  $(n - 1)$  grados de libertad(80).

$$b \pm t(n - 1)S_b \quad \text{Ecuación 4.8.}$$

$$a \pm t(n - 1)S_a \quad \text{Ecuación 4.9.}$$

En la Tabla 17, se resumen los resultados obtenidos para los límites de confianza calculados.

Tabla 17. Resultados de coeficientes de correlación, ecuación de regresión y límites de confianza para los fármacos analizados en el estudio presente.

FÁRMACO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN ( $r$ )	LÍMITES DE CONFIANZA		ECUACIÓN DE LA RECTA $y = a + bx$
		PENDIENTE ( $b$ )	ORDENADA EN EL ORIGEN ( $a$ )	
Sulfadiazina(s)	0,997050	148226,81±3294,20	128819,28±117877,54	$Y=128819,28+148226,81X$
Sulfadiazina(m)	0,999778	261191,29±6332.43	-41275,64±140180.23	$Y = -41275.64+261191,29X$
Sulfadoxina (s)	0,997507	138639,77±4385,86	105075,37±221947,53	$Y = 105075,37+138639,77X$
Sulfadoxina(m)	0,999473	228801,14±8541.25	-40077,54±189076.61	$Y = -40077.54+228801,14X$

Estadísticamente se recomienda valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) superiores a 0,99(80), sin embargo, para bioanálisis valores de ( $r$ ) mayores a 0,95 son aceptables(81). Los coeficientes de correlación obtenidos para cada una de las curvas están por encima de 0,99 indicando buena relación entre las variables dependiente e independiente. Sin embargo, otro parámetro estadístico como ( $r^2$ ) brinda mayor significado estadístico, expresando la proporción de la variación total de  $y$ , explicada por el modelo matemático obtenido (ecuación de la recta); y estos valores se encuentran por encima de 0.99 para los fármacos analizados.

La linealidad de un modelo no está determinada mayoritariamente por el ( $r$ )o el  $r^2$ , sino por un contraste estadístico adecuado que permita la verificación de una significación real del coeficiente de correlación, considerando el número de puntos ( $n$ ) de la determinación. La prueba de significancia ( $t$  Student) que se



fundamenta en determinar un  $t_{experimental}$  y compararlo con un  $t_{crítico}$  correspondiente al  $t_{tabulado}$  a un nivel de significancia determinado, empleando un contraste de dos colas y  $n - 2$  grados de libertad (80). Se plantea una hipótesis nula donde no existe correlación entre las dos variables  $x$  e  $y$ . Por lo tanto, si el  $t_{experimental}$  es mayor que el valor tabulado, se rechaza la hipótesis nula y se acepta que existe una correlación significativa.

El cálculo del valor de  $t$  se obtiene mediante la ecuación 4.2 antes mencionada.

En la determinación de este indicador se plantean dos hipótesis:

$H_0$  o hipótesis nula: Plantea que no existe correlación entre las variables, es decir correlación cero.

$H_1$  o Hipótesis alterna: Se asume que hay una correlación entre las variables  $x$  e  $y$ .

Para la determinación del test estadístico  $t$  *Student* de cada fármaco, se empleó un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ), y considerando 7 niveles de concentración en las curvas patrón del método y del sistema. Por lo cual, para  $n = 5$  grados de libertad, los valores de  $t$  de la tabla de distribución  $t$  son: 2,57 para todas las curvas de calibración.

En la Tabla 18 se presentan los resultados obtenidos en el contraste estadístico de significancia realizado a cada una de las curvas de calibración de los fármacos en estudio.



Tabla 18. Resultados obtenidos en el test estadístico (*t- Student*) para los fármacos en estudio.

FÁRMACO	$r$	$r^2$	$t_{exp}$	$t_{tab}$	$H_o$	CORRELACIÓN LINEAL
Sulfadiazina(s)	0,997050	0,9941080	44,99626	2,57	$\neq 0$	Significativa
Sulfadiazina(m)	0,999778	0,9995560	106,02686	2,57	$\neq 0$	Significativa
Sulfadoxina (s)	0,997507	0,9950211	48,97097	2,57	$\neq 0$	Significativa
Sulfadoxina(m)	0,999473	0,9989462	68,859576	2,57	$\neq 0$	Significativa

Basado en los resultados de la tabla anterior, se puede establecer que existe para todas las curvas analizadas de los fármacos de estudio tanto para el sistema como para el método una correlación de tipo lineal entre las variables  $x$  e  $y$ .

De manera complementaria se realizó un análisis de homocedasticidad de los residuos para corroborar la relación lineal entre las variables de cada una de las curvas. Para ello se calculó el  $y_{ajustado}$  calculado a partir de la ecuación de la recta seleccionada y el residuo por medio de la diferencia entre el  $y_{ajustado}$  y la señal analítica del equipo (área). Seguidamente se realizó un gráfico de *Residuos vs Concentración*, arrojando la información registrada en las Tablas 19-22.

Tabla 19. Análisis de residuos (homocedasticidad) para sulfadoxina (Sistema).

X	Y	Y original	Y ajustado
[ ] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Residuo	Área	Área
0,5	59830,68	74697	10962,62
1	12277,09	145012	89320,01
5	27970,25	480686	219915,65
10	-17706,43	1917362	481106,93
30	6125,61	3837426	1264680,79
50	-219178,51	7776354	7794462,91
120	130681,30	16519501	13018288,60

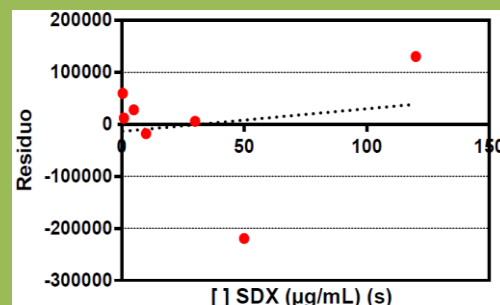


Tabla 20. Análisis de residuos (homocedasticidad) para sulfadoxina (método).

X	Y	Y original	Y ajustado
[ ] (µg/mL)	Residuo	Área	Área
0,2	130410,12	136092,8	5682,7
0,5	61904,87	136227,9	74323,0
1	48115,90	236839,5	188723,6
2	19800,66	437325,4	417524,7
5	-190126,6	913801,6	1103928,2
30	-215556,7	6608400,1	6823956,7
50	145451,6	11545431	11399979,4

Tabla 21. Análisis de residuos (homocedasticidad) para sulfadiazina (método).

X	Y	Y original	Y ajustado
[ ] (µg/mL)	Residuo	Área	Área
0,2	59830,68	70793,3	10962,62
0,5	12277,09	101597,1	89320,01
1	27970,25	247885,9	219915,65
2	-17706,43	463400,5	481106,93
5	6125,61	1270806,4	1264680,79
30	-219178,51	7575284,4	7794462,91
50	130681,30	13148969,9	13018288,60

Tabla 22. Análisis de residuos (homocedasticidad) para sulfadiazina (sistema).

X	Y	Y original	Y ajustado
[ ] (µg/mL)	Residuo	Área	Área
0,5	-140070,69	62862	202932,69
1	-156810,10	120236	277046,10
5	-387320,84	482632,5	869953,34
10	383132,11	1994219,5	1611087,39
30	-321458,10	4254165,5	4575623,60
50	953249,18	8493409	7540159,82
120	-330721,56	17585315	17916036,56



El resultado del análisis de homocedasticidad para todos los fármacos en estudio, tanto para el sistema como para el método, evidencia que la distribución de los puntos en los gráficos es aleatoria y además, no reflejan una tendencia lineal. De igual manera, la ausencia de tendencias en el signo del residuo ( $\pm$ ) muestra un acercamiento al modelo lineal establecido inicialmente.

#### 4.3.2 Precisión

Para estimar la precisión, se realizó el análisis de la repetibilidad instrumental, repetibilidad del método y reproducibilidad en todo el rango de calibración.

Con respecto a los diferentes niveles de concentración, se evaluó la repetibilidad del sistema para los estándares empleados en las curvas de calibración de cada fármaco. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 23. Áreas obtenidas en concentración en tres niveles para estándar de sulfadiazina (Repetibilidad instrumental).

SULFADIAZINA						
Nivel	[ ] $\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área 2	Media	SD	%RSD
2	0,5	105626	97568	101597	5697,87	5,61
4	2	464886	461915	463400,5	2100,81	0,45
7	50	13182226	13115713	13148969,5	47031,79	0,36

Tabla 24. Áreas obtenidas en concentración en tres niveles para estándar de sulfadoxina (Repetibilidad instrumental).

SULFADIAZINA						
Nivel	[ ] $\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área 2	Media	SD	%RSD
2	0,5	131734	140722	136227.9	6355,48	4,67
4	2	451158	423493	437325.4	19562,11	4,47
7	50	11562666	11528196	11545430.6	24373,97	0,21

Tanto para la sulfadiazina como para la sulfadoxina se observa una dispersión mayor en los resultados obtenidos en el nivel más bajo de concentración. Lo que posiblemente se explique a que al disminuir la concentración del analito, se



aumente la señal del ruido instrumental, dificultando la resolución completa de los picos cromatográficos.

Para evaluar la repetibilidad del método se presentan en las Tablas 25 y 26 los porcentajes de recuperación (%R) obtenidos a las concentraciones evaluadas para cada fármaco, en un solo día y a las mismas condiciones instrumentales para la matriz suero. Es importante mencionar que sólo se analizó por duplicado un nivel de cada uno de los fármacos, por disponibilidad de reactivos y equipos, sin embargo, se realizó un dopaje de 5 niveles de concentración con las soluciones estándar, en el rango de linealidad del método.

Tabla 25. Porcentajes de recuperación obtenidos en el dopaje de la matriz suero con sulfadiazina (Repetibilidad del método).

SULFADIAZINA						
Nivel	[ ] µg/mL	% R1	% R2	Media	SD	%RSD
1	1	75,9				
2	2	70,57				
3	5	82,62	82,7	82,66	0,056568	0,07
4	10	67,75				
5	50	88,75				
% *R Medio		77,126				
SD		8,628264				
%RSD		11,19				

\*Corresponde al promedio de % R de una sola determinación de los niveles establecidos.

Tabla 26. Porcentajes de recuperación obtenidos en el dopaje de la matriz suero con sulfadoxina (Repetibilidad del método).

SULFADOXINA						
Nivel	[ ] µg/mL	% R1	% R2	Media	SD	%RSD
1	2	97,0				
2	5	76,36				
3	10	88,02	84,45	86,23	2,524371	2,93
4	20	87,02				
5	50	86,92				
% *R Medio		86,706				
SD		7,303717				
%RSD		8.423				

\*Corresponde al promedio de % R de una sola determinación de los niveles establecidos.





Tabla 27. Resumen de los porcentajes de recuperación obtenidos en el dopaje de la matriz suero con los fármacos de experimentación con sus respectivos %RSD (Repetibilidad del método).

FARMACO	SUERO		
	%R MEDIA	SD	%RSD
SULFADIAZINA	77,126	8,633309	11,19
SULFADOXINA	86,706	7,303717	8,423

Para evaluar la reproducibilidad, se presentan en la Tabla 28 las áreas obtenidas en dos días diferentes de análisis, para muestras reales con tratamiento con Falcidar (PYR-SDX), analizando específicamente la sulfadoxina, en niveles únicos para cada muestra, pero en diferentes días entre sí, cubriendo desde un nivel bajo hasta el alto, de la curva *de calibración*.

Tabla 28. Áreas obtenidas para el fármaco sulfadoxina, en muestras reales de estudio durante dos días diferentes para evaluar la reproducibilidad.

[ ] µg/L CALCULADO	ANTIBIÓTICO	DÍA 1	DÍA 2	%RSD	$t_r$
		ÁREA 1	ÁREA 2		
12.253	M1-SDX	2750704	2763386	0,325	11.4540
18.965	M2-SDX	4263388.4	4299246	0,597	11.4235
30.655	M3-SDX	8195176.8	6973772	11,397	11.4325
33.925	M4-SDX	7460823.2	7721949	2,432	11.4340
39.862	M5-SDX	8902518,8	9080447	1,399	11.4520
42.777	M6-SDX	10667234.8	9747345	6,372	11.4295

Las muestras analizadas en dos épocas diferentes (113 días entre análisis), y volumen-1 corregido a 20 µL.

El criterio de aceptación en lo referente al RSD puede variar dependiendo de la finalidad del ensayo y de la complejidad de la matriz biológica de estudio. Para el análisis de antibióticos en suero es válido considerar valores de RSD máximos de 15%, sin embargo, en rangos cercanos de concentración al límite de cuantificación se considera hasta el 20% (81).

En el estudio de repetibilidad instrumental, los valores de RSD se encuentran por debajo del 6% lo que indica una dispersión pequeña de las áreas obtenidas analizadas para los diferentes niveles de concentración empleados en las curvas de calibración. Por tanto, la precisión del sistema en las condiciones de análisis es elevada.



Los valores de RSD obtenidos en el estudio de repetibilidad del método se encuentran por debajo del 15%, estando algunos de éstos, por encima de los valores obtenidos en el estudio de repetibilidad instrumental. Esto se debe a que en la evaluación del método se tiene en cuenta no solo la precisión del instrumento, sino también todas las etapas involucradas en los procedimientos de extracción y purificación de la muestra. Mientras más etapas formen parte del proceso, significa mayor la manipulación de la muestra y la variación de los resultados será por tanto mayor. Cada etapa aumenta el error en el resultado esperado debido a pérdidas de analito que puedan presentarse en la aplicación del método.

En cuanto a la reproducibilidad, si consideramos que la variación en el tiempo de análisis puede aumentar el %RSD debido a que en el equipo se pueden presentar fluctuaciones en la señal analítica de sus respuestas o la estabilidad de la señal que puede alterarse de un día a otro, ocasionando la dispersión de los datos. No obstante, los resultados son inferiores al 15% de RSD indicado.

La variación del tiempo de análisis puede incrementar el %RSD debido a que el equipo puede presentar fluctuaciones en sus respuestas o la estabilidad de la señal puede alterarse de un día para otro aumentando la dispersión de los datos. Sin embargo, los resultados son inferiores al 15% de RSD mostrando una buena reproducibilidad en el análisis.

La precisión se encuentra asociada a los errores aleatorios que puedan existir en la determinación, los cuales ocasionan resultados individuales diferentes que se alejan del valor medio y que no pueden controlarse ya que su ocurrencia es ocasional. Factores como la complejidad de la matriz, la cantidad de analito, las diluciones realizadas, las etapas de adecuación de la muestra y extracción del analito, las condiciones de operación del equipo y el tiempo de análisis, pueden influir en la variabilidad de los resultados obtenidos. Sin embargo, éstos se encuentran dentro de los criterios de aceptación en el análisis de antibióticos(81); lo cual significa que el método presenta una pequeña variación

entre los diferentes resultados, sin tener en cuenta la variación respecto al valor real; por tanto presenta buena precisión.

### 4.3.3 Selectividad

- Selección de longitud de onda.

Analizando el espectro de longitudes de onda, se determinó particularmente que a concentraciones bajas el espectro que presenta mayor resolución y pico cromatográfico se determina a 270 nm (Figura 32), lo cual, es consistente con lo reportado por Johannessen *et al*, (2005), de 269 nm para sulfadiazina (77) y 265 nm reportado por Trejos, Tello (2008) (83).

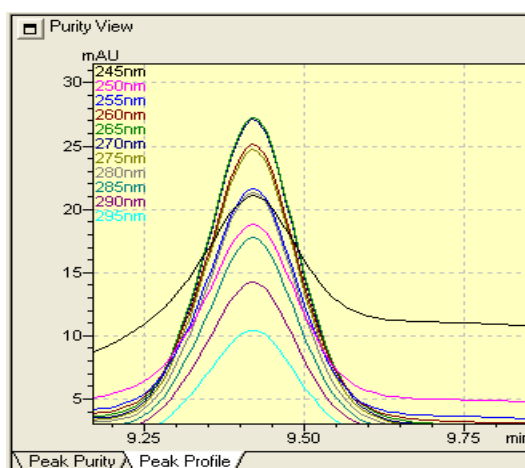


Figura 32. Selección longitud de onda.

Confirmación de identidad: selectividad/especificidad.

Para garantizar que la respuesta cromatográfica se deba únicamente al compuesto analizado (84), se corrieron todos los componentes implicados en el procesamiento y cuantificación de la muestra, juntos y por separado, incluyendo muestras de suero y plasma (controles negativos) sin medicamentos, de lo cual, se observó que éstos, no produjeron ninguna respuesta (pico cromatográfico) al tiempo de retención del analito de interés. Por lo tanto, se puede aseverar que este método posiblemente no presenta interferencias en sus mediciones.

En los cromatogramas mostrados en las Figuras 33 a 36, cabe mencionar que se conservó la escala de tiempo de retención  $t_r$ , para establecer comparaciones entre las señales observadas de los fármacos.

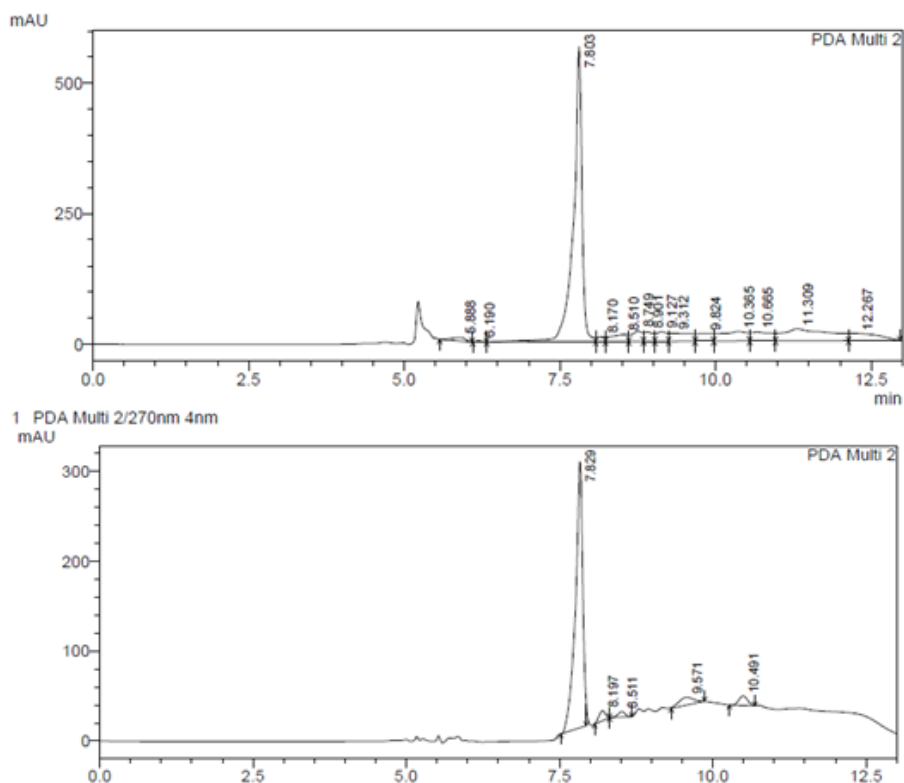


Figura 33. Cromatogramas de suero (matriz) individuo 1 (arriba) e individuo 2 (abajo).

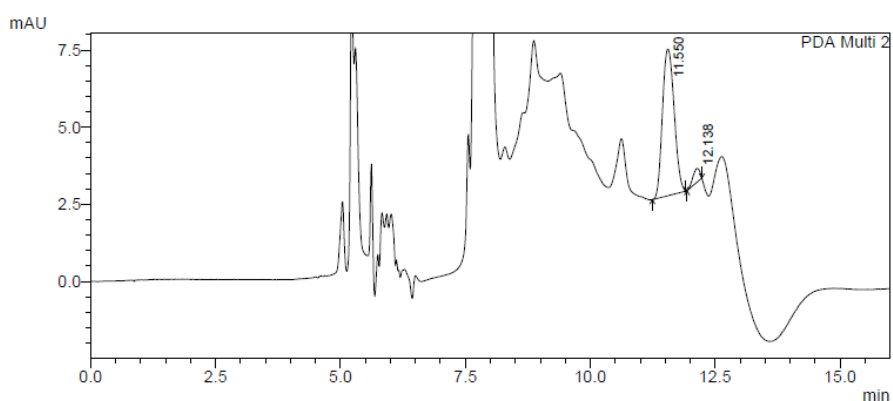


Figura 34. Cromatograma de matriz plasma individuo 1.

Posiblemente en el proceso de obtención de plasma se elimine el metabolito que presenta un pico tan marcado en un tiempo de retención alrededor de 7.8 min, lo

que provoque el cromatograma observado, que sin embargo no es significativo por la intensidad de su señal similar al ruido del equipo.

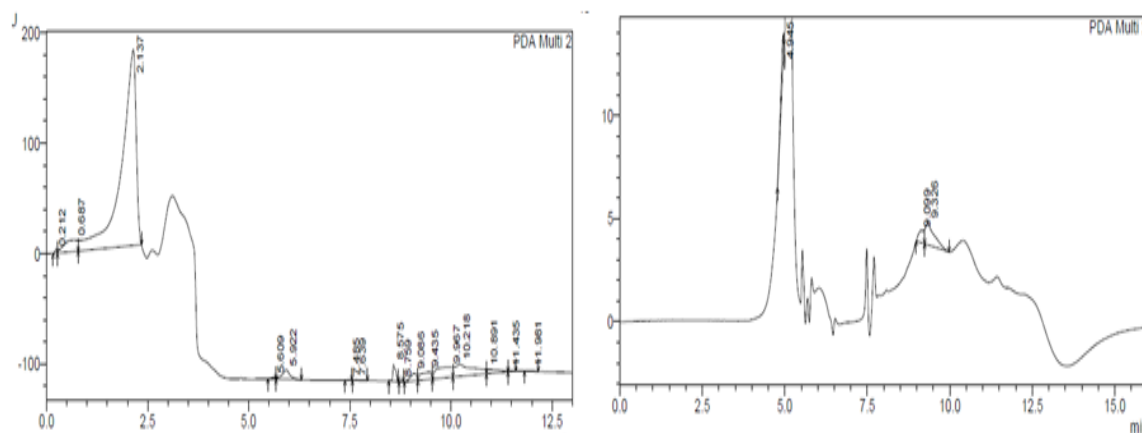


Figura 35. Cromatogramas reactivos (Izquierda) metanol grado HPLC. (Sin picos interferentes), (Derecha)  $\text{HClO}_4$  (5 % v/v) – agente precipitante de proteínas.

Con base en los cromatogramas de las Figuras (33 – 36), no se evidencian solapamientos entre la señal emitida por cada matriz (suero y plasma) y los analitos de interés (suero y plasma dopados con los antibióticos). En los análisis efectuados de cada matriz sin dopar, no se observan señales considerablemente cuantificables, a excepción de una señal alrededor de 7.8 min, la cual, presenta alta resolución e intensidad cromatográfica, que sin embargo, no interfiere de ninguna manera con las señales de los fármacos del estudio (alrededor de 9.4 y 11.6 min, para SDZ y SDX, respectivamente).

El proceso metodológico bajo las condiciones cromatográficas determinadas presenta una selectividad adecuada, debido a que permite la determinación de manera exacta y específica de los medicamentos objeto de estudio sin interferencias significativas por los componentes naturales de la matriz biológica.

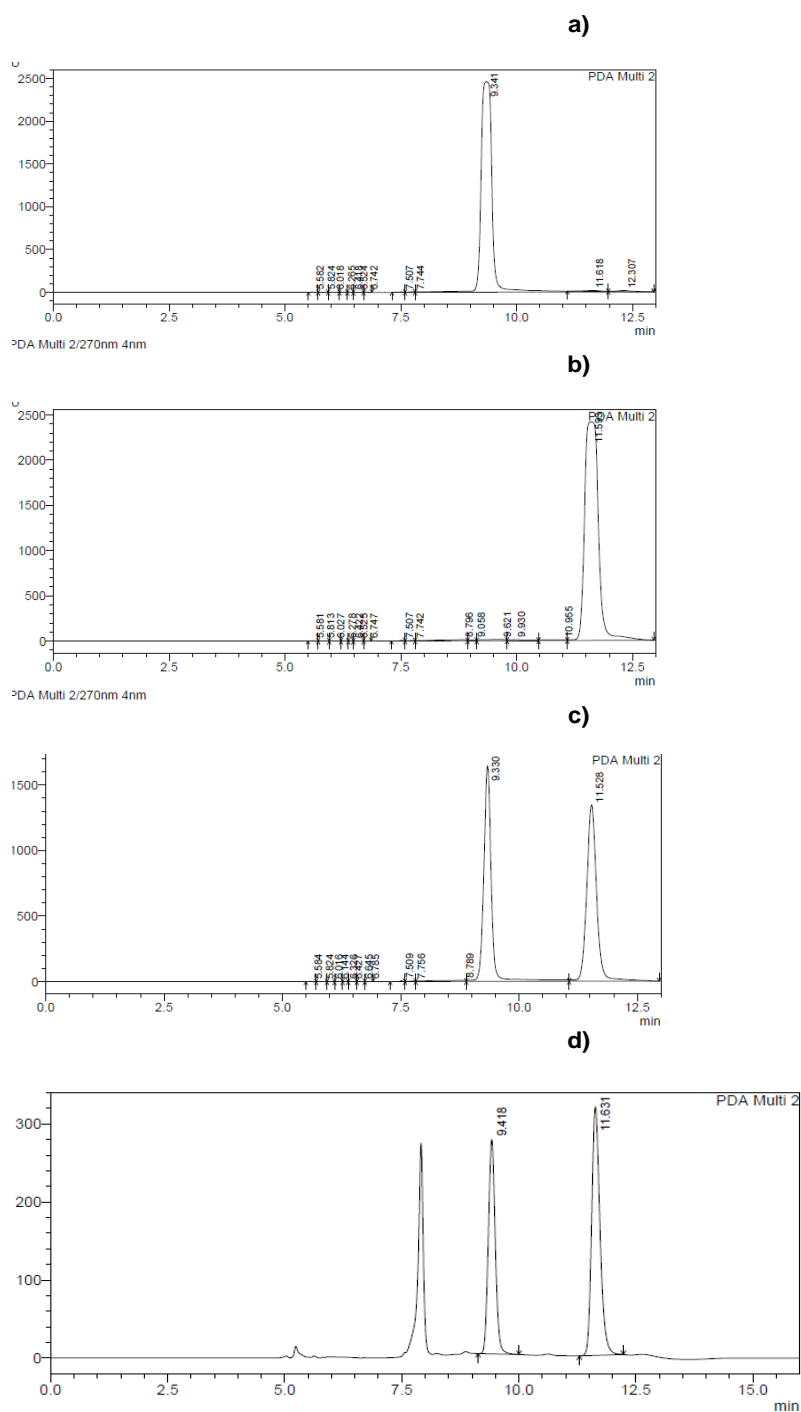


Figura 36. Cromatogramas estándares: a) SDZ 516  $\mu\text{g/ml}$ ; b) SDX 530  $\mu\text{g/ml}$ ; c) mezcla SDZ-SDX en suero 130  $\mu\text{g/ml}$  y d) mezcla de SDZ-SDX en plasma 50  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.3.4 Exactitud

Tabla 29. Porcentajes de recuperación obtenidos para la sulfadoxina en estudio para la evaluación de la exactitud.

SULFADOXINA		
[ ] $\mu\text{g/mL}$ Añadida	[ ] $\mu\text{g/mL}$ Recuperada	(%R)
2	1,940	97
5	3,817	76,36
10	8,620	86,23
20	17,404	87,02
50	44,695	86,92
		$\% \bar{R}$
		SD
		%RSD
		t exp.
		t tab.
		F. exp.
		F. tab.

Tabla 30. Porcentajes de recuperación obtenidos para la sulfadiazina en estudio para la evaluación de la exactitud.

SULFADIAZINA.		
[ ] $\mu\text{g/mL}$ Añadida	[ ] $\mu\text{g/mL}$ Recuperada	(%R)
1	0,759	75,9
2	1,411	70,57
5	4,055	81,09
10	6,775	67,75
50	44,375	88,75
		$\% \bar{R}$
		SD
		%RSD
		t exp.
		t tab.
		F. exp.
		F. tab.



La determinación de este parámetro estadístico se realizó con los datos correspondientes a las Tablas 29 y 30, a partir de las Tablas 25 y 26 para evaluar la precisión del método para SDZ y SDX, respectivamente; en las cuales se tomaron 5 niveles dentro del rango de concentración de la curva patrón de ambos antibióticos, luego, se construyó una curva para analizar la proporcionalidad en las cantidades recuperadas para cada nivel respecto a los otros, analizar el %R, determinar el  $t_{experimental}$  y compararlo con el  $t_{tabulado}$  (3,182) empleando un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ) y considerando 5 medidas sin réplicas, y se calculó el  $F_{experimental}$  que respecto al  $F_{tabulado}$  (10.13), mostraron ambos resultados experimentales una variación proporcional dependiente significativa en el rango analizado, lo que posiblemente indique que hay exactitud aceptable. El  $F$  se determina del anexo 5.

Si tenemos en consideración que el proceso de adición de una solución de estándar de antibiótico conocida a una muestra de suero, probablemente pueda arrojar valores de recuperación diferentes superiores o inferiores a los correspondientes a muestras reales, debido a las múltiples interacciones que posiblemente se puedan dar entre los demás componentes de la matriz y los fármacos. No obstante, esta técnica de estimación de recuperación y la exactitud de un método analítico es usada con regularidad y aceptada (70).

Este procedimiento estadístico es una aproximación al cálculo de la exactitud del método, ya que no se realizaron repeticiones o réplicas en las mediciones de los porcentajes de recuperación individuales. Sin embargo, se evidencia una tendencia lineal proporcional en la cantidad de analito hallada en cada determinación, confirmada por los estimativos de los evaluadores estadísticos *test t de students* y *F- snedecor*.

Se observó, aunque sin replicar un % de recuperación promedio de los nivel de entre 77% para SDZ y 86% para SDX, y un % RSD alrededor de 11.2, valor inferior al 15%, aceptado en la guía de validación de métodos de la FDA sobre estudios en humanos (81).





Se puede inferir que por la complejidad de la matriz (suero sanguíneo), las interacciones con los reactivos de las etapa de adecuación de la muestra y purificación del analito se presentaron interacciones de los fármacos con los reactivos para separar el suero, la restitución y precipitación de proteínas, y los reactivos de la fase móvil, posiblemente fueron las causas principales de la obtención de unos porcentajes de recuperación relativamente bajos. Si tenemos en consideración que la matriz sangre tiene compuestos como lípidos, sales, hormonas entre otros, compuestos que pueden competir con los analitos de interés por los sitios activos de la fase estacionaria dejan pocos sitios activos para que el analito se enlace, produciendo pérdidas y baja respuesta instrumental.

En relación con el test *t-Student* se determinó para ambos antibióticos un  $t_{calculado} > t_{tabulado}$ , permitiendo afirmar que el método presenta exactitud para un grado de significancia  $\alpha$  igual a 0.05, comprobando que existe una pendiente significativa distinta a cero (69).

Es válido mencionar que factores como el vaciado de sustancias, los procedimientos de pesada, las respuestas del equipo de un día a otro, las diluciones, entre otros muchos aspectos, generan errores en las mediciones efectuadas, por tanto, es fundamental realizar los procedimientos de la manera más minuciosamente posible.

#### **4.3.5 Sensibilidad**

Para la determinación de la sensibilidad analítica se procedió a emplear el método basado en la relación señal/ruido, empleando la señal instrumental dada por el blanco o placebo (69), que en el trabajo presente corresponde al suero de personas que no han recibido el tratamiento, y por ende no deben presentar una señal por parte del equipo en los tiempos de retención específicos de la SDZ y SDX, a no ser, que ésta fuera causada por una sustancia propia de la matriz y fuera un interferente en la señal.



Se debe mencionar que la determinación del área promedio de la señal del ruido del blanco, arrojo unos valores inferiores que los encontrados usando los datos de las Tablas 14, 15 y 16, e interpolando a concentración cero, y considerando 3 veces la desviación estándar del intercepto o error aleatorio en la dirección  $y$ . Lo cual, es explicable posiblemente debido al amplio rango de la curva patrón.

Los valores estimados por ambos parámetros (L.D. y L.Q.), se relacionan en la Tabla 31.

Tabla 31. Límites de detección y cuantificación para SDZ y SDX.

ANTIBIÓTICO	L.D. ( $\mu\text{g/mL}$ ) Área Pro.	L.Q. ( $\mu\text{g/mL}$ ) Área Pro.	L.D. ( $\mu\text{g/mL}$ ) Curva	L.Q. ( $\mu\text{g/mL}$ ) Curva
Sulfadiazina	0,28409	1,13636	1,35883	4,52945
Sulfadoxina	0,32351	1,29420	2,09227	6,97424

Sería posible tomar con criterio de aceptación los niveles terapéuticos en los que posiblemente se evidencie una respuesta adecuada al tratamiento, y que están a valores superiores de los límites registrados en la Tabla 31, como lo encontrado por Trenque, *et al*, (2), en matriz de plasma de 46,1  $\mu\text{g/mL}$ , aunque en un rango muy amplio de concentraciones, y empleando condiciones cromatográficas diferentes. Considerando otro informe similar, donde, se reporta una mediana de 42,39  $\mu\text{g/mL}$  (1), pero en un tratamiento en malaria, y haciendo la extrapolación que por ser una infección ocasionada, de igual forma por un parásito (*Plasmodium falciparum*), pudiera presentarse un comportamiento de algún modo parecido a la respuesta terapéutica en toxoplasmosis, donde los niveles sanguíneos pudiesen estar en concentraciones cercanas, se podría inferir que los resultados obtenidos para el L.D. y L.Q., son adecuados para los análisis propuestos en los objetivos; lógicamente se debe considerar que los efectos de ambos parásitos en los niños son muy diferentes.



#### 4.4 CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos, y teniendo en consideración algunas limitaciones experimentales, además, de las características particulares de una matriz biológica (suero sanguíneo), se verificó al máximo posible algunos atributos de calidad relevantes para la metodología utilizada como: linealidad, la precisión, la exactitud, la selectividad, y la sensibilidad.

Se determinó mediante la valoración de la linealidad que existe una correlación lineal entre la señal analítica instrumental y la concentración de los fármacos estudiados en el rango de calibración establecido, y bajo las condiciones cromatográficas empleadas, indicando claramente que los resultados son directamente proporcionales a la concentración de los fármacos empleados.

En la verificación de la precisión, tanto instrumental, como del método, se pudo determinar valores de %RSD, dentro de los rangos de aceptación para estudios bioanalíticos, indicando que los datos están cercanos y agrupados a un valor promedio.

En relación con el estudio de la reproducibilidad, el %RSD mostró valores superiores al correspondiente en la repetibilidad, pero inferior a límite de aceptación.

Aunque el porcentaje de recuperación está incluso por debajo del 90%, si se considera el tipo de matriz biológica, los procesos de adecuación y purificación, las diluciones, la cantidad real del analito en las muestras sanguíneas originales, y la señal analítica producida por la presencia de analitos en las condiciones cromatográficas establecidas, se puede establecer que el rendimiento de método analítico es satisfactorio.

Según la información obtenida, es posible afirmar que el método analítico presenta confiabilidad y sensibilidad, para la determinación y estudio de los niveles de los fármacos (SDZ y SDX) en concentraciones terapéuticas de tratamiento (1, 2).



## CAPÍTULO 5

### EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FÁRMACOS EN SUERO SANGUÍNEO DE NIÑOS CON TC

---

*El presente capítulo muestra los resultados obtenidos luego de la aplicación del método de cromatografía de Líquidos de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos DAD), para la determinación de los antibióticos SDZ y SDX, que fue desarrollado y verificado previamente en la matriz de suero sanguíneo. Se describen los criterios y procedimientos que se consideraron para realizar la toma de las muestras en el Instituto de Biomédicas de la Universidad del Quindío, al igual, que el análisis de los resultados obtenidos. Dicha información permitió determinar los niveles de los fármacos de estudio en la matriz biológica, resultando posible su cuantificación para poder verificar los niveles de los mismos en la sangre de los niños bajo tratamiento médico, y poder establecer algunos elementos en la farmacocinética de seguimiento al éxito terapéutico dado.*

---



## 5.1 INTRODUCCIÓN

La TC es la infección parasitaria causada por el *Toxoplasma gondii*, con amplia diseminación a nivel global, que produce graves lesiones en los infantes cuando no se hace un tratamiento oportuno, y dependiendo de la época de afectación. Todavía no hay una vacuna contra la TC, sin embargo, las acciones más pertinentes para enfrentarla son la prevención, pero cuando ya hay indicios de su afectación es imperativo un diagnóstico asertivo e inicio inmediato de tratamiento, y la necesidad de que se realice un seguimiento en tiempo real, que evalué la respuesta terapéutica de los niños, relacionando los niveles en sangre de los fármacos empleados, y poder establecer las acciones correctivas terapéuticas eficaces y se pueda disminuir al máximo secuelas futuras y posibles efectos secundarios como toxicidad, reacciones alérgicas entre otras. Por tanto, todos los esfuerzos científicos que se realice para tener cada vez más conocimiento sobre la farmacocinética de los tratamientos empleados para enfrentar la TC, resultan pocos frente a los efectos permanentes e incapacitantes que genera en los niños afectados cuando no son diagnosticados y ni tratados adecuada y oportunamente.

## 5.2 METODOLOGÍA

### 5.2.1 Localización geográfica

Los niños diagnosticados con (TC) objeto de estudio son oriundos del departamento del Quindío, el cual, se encuentra localizado en la zona centro occidente del país (flanco occidental de la Cordillera Central), con una extensión de 1.961,8 km<sup>2</sup>, coordenadas 4° 44´ y 4° 04´ latitud norte; y 75° 52´ y 75° 24´ longitud oeste.

El Departamento presenta entre otras las siguientes características biofísicas:

1. Hace parte de la Cuenca Hidrográfica del Río La Vieja, con un sistema hídrico departamental importante, y gran cobertura vegetal.

2. Presenta dos zonas morfológicas claras, una de montaña, correspondiente a la Cordillera Central, y otra de piedemonte o zona plana.

3. Diversidad de pisos climáticos (desde los 1.180 msnm, 10 en La Tebaida, hasta los 4.500 msnm en el Parque de los Nevados) y presencia de variados tipos de paisaje(85). Todos estos aspectos posiblemente hacen que el departamento tenga unas condiciones particulares para la proliferación natural del parásito *Toxoplasma gondii*, y se presente una incidencia característica importante de la infección frente al contexto nacional.



Figura 37. Mapa político del Departamento del Quindío, con ampliación en el mapa nacional.

### 5.2.2 Muestreo

El muestreo se realizó en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío entre el año 2002 y 2011, donde algunos pacientes fueron remitidos al Centro de Investigaciones Biomédicas, y otros fueron diagnosticados en el mismo Centro.

Del total de los casos atendidos en dicho periodo, los cuales tuviesen reportes de seguimiento en cuanto a dosificación de SDX-PYR, y niveles de IgG y Hb. Ningún otro factor se consideró para el muestreo.



Es importante mencionar que las muestras problema corresponden a muestras de suero de niños determinados como infectados con TC, entre el año 2002 y 2011, en el Departamento del Quindío.

Los análisis realizados fueron de tipo cualitativo y cuantitativo de los fármacos empleados en el tratamiento de la TC, de igual forma, se realizaron otras determinaciones para medir el grado de estabilidad y degradación en el tiempo de los fármacos en las muestras, particularmente en el tiempo del medicamento sulfadoxina, en comprimidos comerciales en este caso (Falcidar®) del laboratorio Roche Ltda, Basilea, Suiza. Con registro RJ0004V, fabricado el 01/2004, y con vencimiento el 01/2007, frente al patrón secundario certificado de sulfadoxina, suministrados por el laboratorio ORBUS PHARMA LTDA de Bogotá D.C. Colombia.

En el presente estudio se realizó una aproximación para medir el efecto matriz de forma indirecta en la preparación de la curva patrón, ya que se empleó con alguna restricción en el número de concentraciones disponibles para las curvas patrón preparadas en suero, plasma, metanol y con el medicamento Falcidar de ROCHE.

5.2.2.1 Recolección de las muestras: Este proceso se llevó a cabo en el laboratorio de Biomédicas de la Universidad del Quindío, donde se recolectaron muestras de sangre venosa, de aproximadamente 8 mL, en tubo de centrifuga con anticoagulante para suero, y sin anticoagulante para plasma, luego se centrifugaron por 5 min, seguidamente, por decantación, y con micropipeta, se tomó el sobrenadante se almacenó en tubos eppendorf y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Similar tratamiento sufrieron las muestras tomadas para el control negativo, lógicamente, sin el mismo tiempo de almacenamiento en congelación.

Estos sueros de niños con TC, fueron almacenados en un periodo comprendido entre el año 2002 y el 2011, a los cuales, se les ha realizado seguimiento clínico de la enfermedad.

### 5.2.3 Purificación de los fármacos.

La metodología empleada fue adaptada del método desarrollado por Johannessen *et al.* (77), que se mostró en el capítulo anterior. Del cual, las etapas de extracción y purificación de fármacos que se muestran en la Figura 31 y cuyas condiciones fueron verificadas con anterioridad, se aplicaron a la matriz suero para las curvas patrón realizando el análisis por duplicado. También se realizó similar análisis a blancos de matrices suero y plasma, así como también, a blancos de reactivos con el fin de verificar la ausencia de los fármacos de estudio, y/o la presencia de picos cromatográficos interferentes.

### 5.2.5 Cuantificación de fármacos

Para la cuantificación de los fármacos (SDZ y SDX), se empleó un equipo de cromatografía de líquidos en fase reversa con detector de arreglo de diodos (RP-HPLC-DAD) Figura 38, el cual proporcionó para los analitos detectados, una concentración en  $\mu\text{g/mL}$ . Dicha concentración fue determinada por interpolación a partir de las curvas de calibración que se describen en el Capítulo 4 Tabla 17, donde la variable independiente es la concentración del analito en  $\mu\text{g/mL}$  y la variable dependiente corresponde al área (señal analítica instrumental). El método desarrollado corresponde a uno de patrón externo.



Figura 38. Rose Parra Ch. Fotografía del sistema cromatográfico RP-HPLC-DAD (2013).





La identificación se realizó por comparación entre los tiempos de retención ( $t_r$ ) obtenidos en el análisis cromatográfico de las muestras y los ( $t_r$ ) de los cromatogramas obtenidos para los diferentes niveles de la curva de calibración. Además, fue importante considerar los ( $t_r$ ) de los cromatogramas obtenidos para cada matriz dopada, que se describen en los Capítulos 3 y 4, respectivamente.

Los datos dados por el equipo suministraron información directa sobre la concentración en  $\mu\text{g}$  de antibiótico/mL de muestra de suero, resultando significativo mencionar que tanto las curvas de calibración como los porcentajes de recuperación ( $\%R$ ) para cada antibiótico, presentaron diferentes resultados.

#### **5.2.6. Correlación nivel de Hb vs SDX residual**

Si bien, para la realización de una evaluación clara sobre la concentración de un fármaco en sangre luego de una dosificación del mismo de una formulación farmacéutica, se requiere del estudio de parámetros particulares que miden la calidad de un producto farmacéutico como la biodisponibilidad (BA) y bioequivalencia (BE), que en síntesis se enfocan en la velocidad y medida de liberación de una sustancia farmacológica de un medicamento y su absorción posterior en la circulación sistémica (86), con los datos de la Tabla 34, y graficados en la Figura 43, básicamente lo que se pretende es mostrar un rango aproximado de concentración en el cual posiblemente se halle la SDX residual, con base a la dosificación terapéuticas suministrada, y en la respuesta clínica de diferentes pacientes del estudio y que responden posiblemente a una variabilidad interindividual, y que puedan tener alguna incidencia en los niveles Hb, cuando son empleados en el tratamiento contra la TC.

Posiblemente exista una correlación entre la dosificación de un medicamento y el nivel de Hb, sin embargo, el SDX residual puede ser un indicativo del nivel de absorción del mismo, y mostrar si con un rango de concentración se evita la reactivación de la parasitosis, entre otros aspectos.



### **5.2.7. Correlación nivel de IgG vs SDX residual**

Este análisis se planteó considerando dos pacientes, que presentaran respuestas terapéuticas disimiles para estudio de los factores que posiblemente puedan generar y/o inducir las respuestas terapéuticas obtenidas por los niños infectados con TC. Para lo cual, se consideró los pacientes que tuvieran varias muestras que correspondieran a un seguimiento en el tiempo, con registros de los parámetros de IgG, y los demás característicos del seguimiento por TC.

#### **5.2.7.1 Respuesta terapéutica tratamiento (SDX-PIR) comercial, paciente A:**

Este paciente se consideró, para el estudio, ya que presentaba un número importante de muestras, presentaba el seguimiento más amplio de todo el estudio, con incluso una muestra de 49 meses.

#### **5.2.7.2 Respuesta terapéutica tratamiento (SDX-PIR) comercial, paciente B:**

La inclusión de este paciente radico en que presentaba valores de IgG muy altos en todas las muestras analizadas superior 370 UI/mL, que resulta ser muy significativo, ya que el paciente recibió el tratamiento terapéutico similar a otros niños del estudio, pero su respuesta inmunológica presentó una gran variabilidad.

### **5.2.8 Estabilidad de las tabletas de Falcidar (SDX-PYR) comerciales**

Este análisis se estableció para medir de alguna manera el grado de degradación, derivatización o deterioro en el tiempo de uno de los fármacos objeto de estudio, y que posibilitara establecer algún tipo de comportamiento terapéutico, o del análisis cromatográfico de muestras con mucho tiempo de almacenamiento.

Por tanto, se analizó la SDX en las tabletas de Falcidar comercial, del laboratorio Roche Ltda, Basilea, Suiza, con registro RJ0004V, fabricado el 01/2004, y con vencimiento el 01/2007, frente al patrón secundario certificado de SDX, suministrados por el laboratorio ORBUS PHARMA LTDA de Bogotá D.C. Colombia. (Medicamento similar al suministrado a los niños infectados con TC).



### **5.2.9 Incidencia de la matriz de disolución.**

Resulta importante considerar aquellas variaciones en la señal analítica cromatográfica de un analito de interés, que pueda ser causada por la presencia de otras sustancias constituyentes de la matriz del analito, como puede ocurrir en las muestras de origen biológico como sangre y orina, entre otras, que puedan generar cambios significativos (71), es cuando se debe hablar del Efecto Matriz. Por tanto, para su determinación, se requiere del uso de un estándar interno en el método, lo que no se uso en el presente estudio, sin embargo, al contar con mediciones de los fármacos de interés en varias matrices, se consideró la posibilidad de establecer algún tipo de variabilidad.

### **5.2.10 Análisis de datos**

El presente trabajo es un estudio observacional, retrospectivo longitudinal y descriptivo, de implementación de método de laboratorio, donde se utilizó el muestreo aleatorio simple. Los datos fueron recolectados de las historias clínicas registradas en el laboratorio de Biomédicas de la Universidad del Quindío, durante el periodo de tiempo mencionado.

Debido a la naturaleza del trabajo corresponde a uno de bioanálisis (con muestras biológicas), en una matriz de alta complejidad, de una población relativamente pequeña, que sin embargo, resulta difícil de analizar en su totalidad, el método estadístico que se aplicó para el análisis de datos fue el inductivo (de lo particular a lo general), el cual permite estimar o predecir el comportamiento de una característica de una población a partir de la información obtenida de una muestra aleatoria que pertenece a la población y que es representativa (87). Si bien, el anterior procedimiento debería realizarse en toda la población afectada, por las características de la infección y por los graves y permanentes daños en la salud e incidencia en el futuro desarrollo de los niños, este tipo de procedimientos todavía no son de obligatoria aplicación.



Los software utilizados para el análisis de datos, construcción de gráficos y edición de bibliografía fueron: OriginPro 8 SR0, GraphPad Prism versión 6.03, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 14 y EndNote X4.

Es procedente previo análisis de los datos experimentales obtenidos verificar si los resultados de concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidos muestran una distribución normal. Debido a que el tamaño de la muestra de estudio es pequeña ( $<50$ ), el estadístico de normalidad de mayor fuerza es la prueba de *Shapiro-Wilk*, en la cual, se establece como hipótesis nula que los datos de concentración de SDX obtenidos presentan una distribución normal. Por consiguiente, si el nivel crítico (Sig.) resulta ser menor al nivel de significación estadístico establecido ( $\alpha=0,05$ ), se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos no presentan una distribución normal. Sin embargo, si este valor resulta ser mayor a 0,05 se concluye que los datos siguen una distribución normal.

Similar tratamiento estadístico se realizó a los datos de niveles de inmunoglobulina G (IgG) y hemoglobina (Hb), suministrados por el Centro de Biomédicas, de la Universidad del Quindío; fruto del tratamiento y seguimiento terapéutico a los niños infectados en el estudio; información retrospectiva que el presente estudio no tuvo control e injerencia.

Con la información anterior se procedió a identificar algún tipo de generalidad terapéutica, frente a los niveles en suero de IgG y Hb, durante un periodo de tiempo, con la limitante de contar con un número bajo de muestras con la particularidad de ser únicas para el estudio.

## **5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.3.1 Muestreo**

Una vez establecido el muestreo en total se analizaron 47 muestras de suero de 4 niños y 6 niñas con edades entre 1 y 49 meses, con rango de muestras por niño entre 1 y 8, registrados y atendidos en el Centro de Salud de la universidad del Quindío.



Las muestras de suero y el plasma usados como control negativo, fueron obtenidas de voluntarios que certificaron no haber consumido los medicamentos de análisis (SDZ, SDX y PYR), para ningún tratamiento médico. También se les realizaron análisis de laboratorio para determinar anticuerpos antitoxoplasma (IgG), encontrándose una IgG de 0.0 para la analista de laboratorio, y de 108 UI/mL para el otro voluntario, lo que indica que este último en algún momento de su vida tuvo contacto con el parásito.

Luego de procesar la información se establecen 33 muestras finales para el análisis. En la Tabla 32 se presentan la dosis de medicamento al momento del muestreo expresada en  $\mu\text{g}$ , y los niveles de Hb, IgG y SDX residual.



Tabla 32. Concentración de SDX en µg/mL y datos históricos clínicos de IgG y Hb en suero de niños con TC en el Departamento del Quindío.

Código	Paciente	Fecha	Edad	**Dosis cm <sup>3</sup>	IgG(Ul/mL)	Hb (g/dL)	Media SDX µg/mL	SD	%RSD
10	1	16/08/2002	13	4	10	--	17	-	
18	2	29/04/2003	6	2,8	10	11	32,4	-	-
18	2	02/07/2003	9	3	-	9,6	0	-	-
61	3	09/08/2006	22		355	12.8	15,2	-	-
63	4	28/05/2007	24	4,4	99	13,6	*39,4733	0,5497048	1,39
66	5	27/04/2006	13	4	24	-	*30,25	0,571554	1,89
66	5	30/05/2006	14	4	0	-	8,5526	-	-
66	5	25/07/2006	16	4	2,2	-	30,5057	-	-
66	5	02/11/2006	20	4	0	-	17,9781	-	-
66	5	21/02/2007	23	0	8,7	-	2,5269	-	-
66	5	22/04/2009	49	0	48,9	-	0,256	-	-
95	6	04/05/2009	2	1,5	179	9,6	*44,7	2,8429228	6,34
95	6	17/11/2009	8	0	41	11,1	0	-	-
95	6	15/12/2009	9	0	0	12,4	0	-	-
98	7	24/04/2009	0	2,4	186		0	-	-
98	7	10/06/2009	2	2	255	10,9	9,2	-	-
98	7	07/07/2009	3	2,5	290	10	*18,89	0,1104501	0,58
98	7	05/08/2009	4	2.5	148	-	12,9	-	-
98	7	02/09/2009	5	-	186	10,2	0	-	-
98	7	12/05/2010	13	2,5	-	12	10,2	-	-
103	8	17/06/2009	2	2-	281	11	22,9	-	-
103	8	20/08/2009	4	2	138	-	*33,35425	0,80716239-	2,42-
103	8	08/10/2009	6	-	-	9,8	0,2284		
105	9	13/08/2009	1	2	393		0	-	-
105	9	10/09/2009	2	2,5	413	12	0	-	-
105	9	21/10/2009	3	2,5	412	12	15	-	-
105	9	18/01/2010	6	3	407	11,6	21	-	-
105	9	03/03/2010	8	8	372	12	20	-	-
105	9	08/04/2010	9	8	384	11	6	-	-
105	9	28/03/2011	18	0	464	13	0	-	-
118	10	18/05/2011	3	3,5	347	7,3	0	-	-
118	10	10/08/2011	6	-	255	-	35	-	-
118	10	02/11/2011	9	-	281	-	*12,2252	0,0393151	0,32
<b>% RSD. Promedio</b>									1,92

\*Muestras leídas en tiempos diferentes y condiciones diferentes, mostrando una alta precisión del método.

\*\*La dosis suministrada para todos los niños fue la misma, 25 mg/Kg de peso, y se suministró en solución.

### 5.3.1 Cuantificación de Fármacos

Las muestras extraídas y purificadas de la matriz suero de los niños infectados con TC, se inyectaron al RP-HPLC-DAD, y con la intensidad de la señal producida por cada muestra se procedió a identificar y cuantificar el fármaco de interés (SDX).

En la Figura 39 se presentan dos cromatogramas reales de la misma muestra del paciente A, leídas en la curva patrón suero SDX final en épocas diferentes.

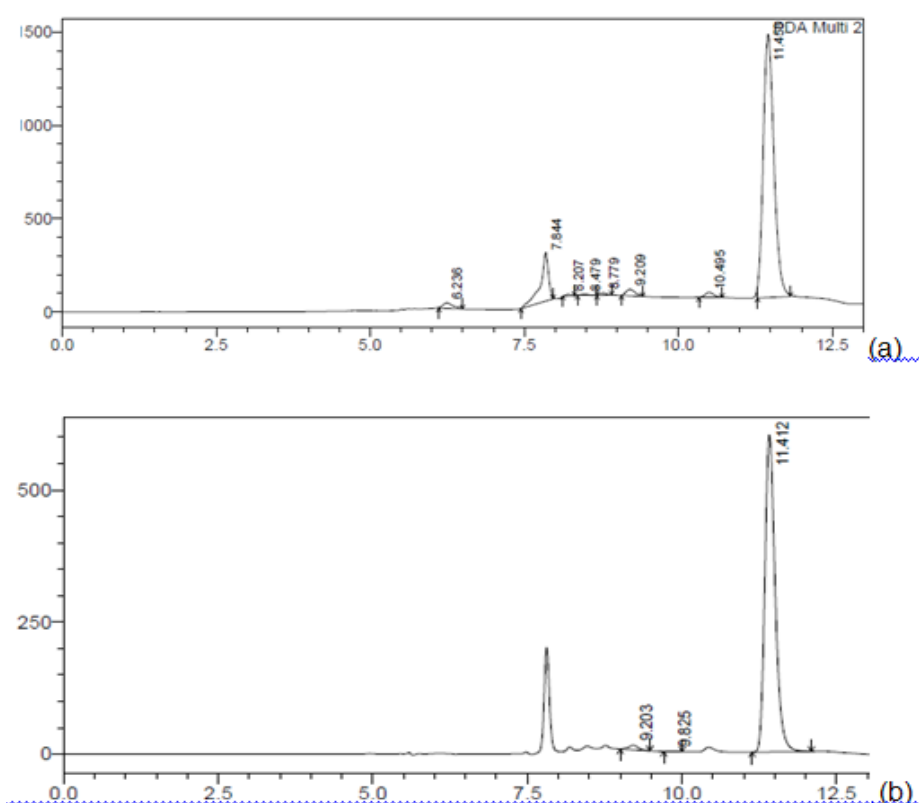


Figura 39. Análisis 1 muestra paciente A, 19/10/2012 (a), análisis 2 muestra paciente A, 09/02/2013 (b).

Tomando como ejemplo los cromatogramas de la Figura 39, donde se encontró para el análisis 1 un área de 6788877 y para el análisis 2 un área de 6973772

La curva de calibración para el fármaco SDX responde a la ecuación 5.1, que se muestra a continuación.



$$y = a + bx$$

Ecuación 5.1.

Donde:

y : Área (señal analítica del equipo).

x : Concentración de analito ( $\mu\text{g/mL}$ )

Con esta información, se procedió a calcular la concentración en  $\mu\text{g}$  de SDX/mL de solución (suero), empleando la curva de calibración descrita en el Capítulo 4 Tabla 17.

Empleando la ecuación 5.1, reemplazando los valores de la curva de calibración para SDX se tiene:

$$y = -40077.54 + 228801,14 x.$$

La concentración en  $\mu\text{g/mL}$  para el análisis 1 fue calculada de la siguiente forma:

$$x_1 = \frac{6788877 + 40077,54}{228801,14} = 29,84668 \mu\text{g/mL}$$

Para el análisis 2 la concentración calculada fue:

$$x_1 = \frac{6973772 + 40077,54}{228801,14} = 30,65478 \mu\text{g/mL}$$

Similar procedimiento se aplicó a todas las muestras que en el análisis cromatográfico mostraron la presencia del fármaco SDX y una vez calculada la concentración, se estimó la media y el %RSD, de las muestras que presentaban varias mediciones. En la Tabla 32 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de SDX de cada una de las muestras establecidas. Para las muestras analizadas 1 y 2 se obtuvo como media 30,25 y un %RSD de 1,89 lo que podría indicar que el método tiene una alta precisión, y que el fármaco SDX presenta gran estabilidad en las muestras de análisis, ya que entre ambos análisis transcurrieron 113 días, además, las muestras sufrieron varios ciclos de descongelación.

### 5.3.2 Correlación del nivel de Hb vs SDX residual.





Con los datos determinados de SDX residual de la tabla 32, y con los registros históricos de Hb de los niños del estudio, se analizó un promedio de 11 muestras, considerando como variable independiente la media de las edades en meses de los niños. A estos datos se les realizó un análisis estadístico para determinar qué tipo de distribución presentaban tanto los datos de Hb como de los niveles de SDX residual. En la Tabla 33 se presentan los valores de los niveles de Hb y SDX residual.

Tabla 33. Variación del nivel de Hemoglobina (Hb) vs Sulfadoxina (SDX) residual en suero.

MUESTRAS.	EDAD (meses)	Hb (g/dL)	SD	%RSD	SDX (µg/mL)	SD	%RSD
1	2,0	10,9	6,11256	44,13	19,2	19,43005	101,20
2	3,0	9,80	2,35867	24,15	11,30	9,974669	88,23
3	4,0	10,0	-	-	23,12712	14,46333	62,54
4	5,0	10,2	-	-	0,2	-	-
5	6,0	10,8	0,91652	8,49	17,87613	16,31170	91,25
6	8,0	11,55	0,63639	5,51	10	14,14213	141,42
7	9,0	11,0	1,4	12,73	9,1126	4,401881	48,30
8	13,0	12,0	-	-	19,15	10,19644	53,24
9	18,0	13,0	-	-	0,0	-	-
10	22,0	12,8	-	-	15,2	-	-
11	24,0	13,6	-	-	39,48	-	-
Parámetros Estadísticos.					Valor		
N		11			11		
Promedio		11,4227			14,9672		
I.C. Inferior		10,5606			7,5300		
I.C. superior		12,2848			22,4044		
(SD)		±1,28323			±11,0704		
W		0,937			0,930		
Valor de P		0,483			0,409		
Significancia		n.s.			n.s.		

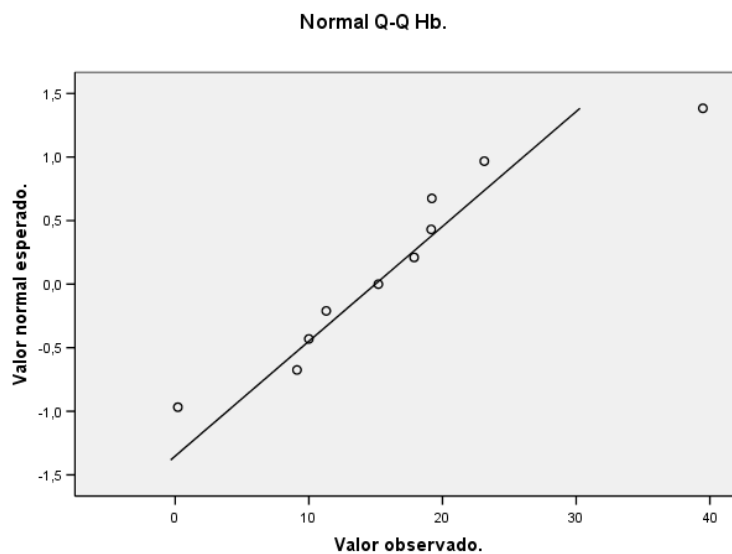


Figura 40. Gráfico Q-Q normal para la Hemoglobina en suero obtenido mediante el SPSS.

Como el estadístico  $W$  es  $>$  que el nivel de significancia de la prueba ( $\alpha$ ) que es el 5%, o sea 0,05, entonces se acepta la hipótesis nula  $H_0$ , que establece que probablemente la distribución de la hemoglobina en sangre de estudio puede modelarse de una población normal, además, el valor  $p$  es grande (0,483) lo que sustenta en mayor medida la aceptación de  $H_0$ .

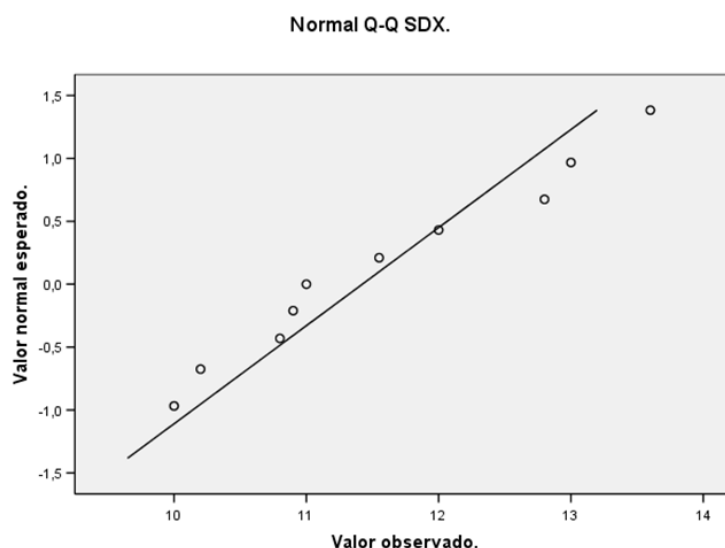


Figura 41. Gráfico Q-Q normal para la Sulfadoxina en suero obtenido mediante el SPSS.

Como el estadístico  $W$  (0,930) es  $>$  que el nivel de significancia de la prueba ( $\alpha$ ) que es el 5%, o sea 0,05, entonces se acepta la hipótesis nula  $H_0$ , que establece

que la probablemente la distribución de la SDX en sangre de estudio puede modelarse de una población normal, además, el valor p es grande (0,409) lo que sustenta en mayor medida la aceptación de  $H_0$ .

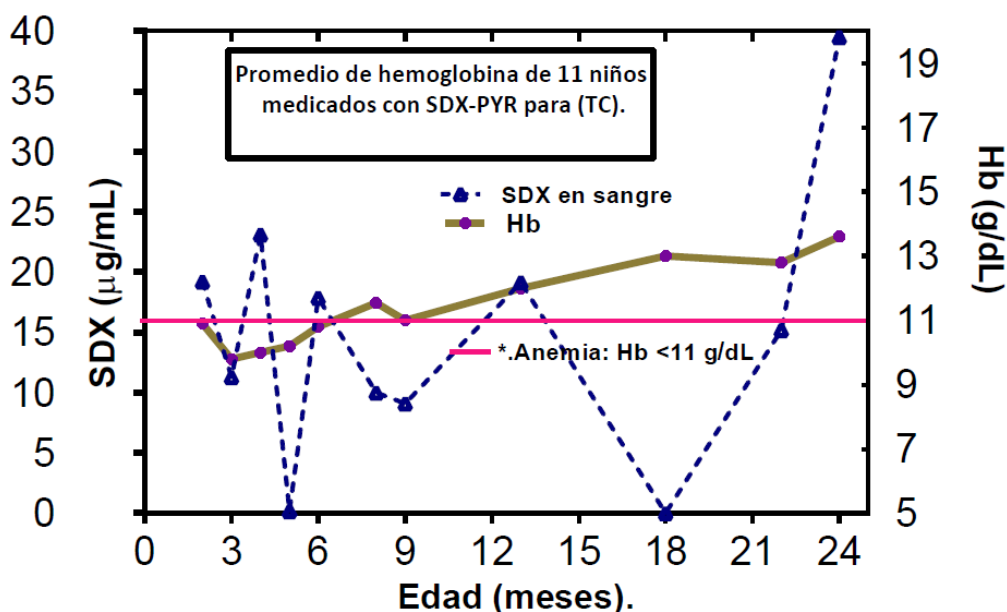


Figura 42. Variación del nivel de Hemoglobina (g/dL) vs SDX (mg/mL).

Luego de la identificación de la infección por *Toxoplasma gondii*, en los infantes, e iniciar el tratamiento terapéutico se realizaron periódicamente análisis sanguíneos donde se determinaron los siguientes parámetros diagnósticos clínicos: IgG, IgM, IgA, Hb, recuento de leucocitos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, monocitos, hematocritos, % de avidéz, niveles de SDX en suero, los índices hematimétricos (VCM, HCM), recuento de plaquetas, y de igual manera, peso corporal, presencia de ictericia, esplenomegalia y hepatomegalia. Luego se procedió a realizar una correlación para determinar de qué manera posiblemente inciden los niveles de medicamento, sobre la concentración de hemoglobina en sangre, y la posible aparición de cuadros anémicos en los pacientes.

Del planteamiento anterior se establecen varios aspectos:

Posiblemente luego de la infección toxoplásmica, y de la evolución de la misma, hasta el momento de diagnóstico, se disminuyan significativamente los niveles



de hemoglobina en los niños, en los primeros 4 o 5 meses de vida, a niveles inferiores del punto de corte de 11 g/dL de hemoglobina para considerarse un cuadro anémico(88, 89), lo que probablemente se revierta con el inicio de tratamiento con SDX–PYR, (sin olvidar que los antibióticos generalmente disminuyen los glóbulos rojos), y un suplemento de ácido fólico (para el presente tratamiento), en el caso de la toxoplasmosis. *Uscateguí, et al (2009)*, en un estudio realizado para comparar el efecto de la intervención simultánea con antipalúdicos, antiparasitarios y un suplemento de retinol sobre la evolución de la hemoglobina, ferritina, y la proteína C, donde concluyeron que el suplemento de retinol, la desparasitación intestinal simultánea con el tratamiento antipalúdico para los casos de malaria producida por el *Plasmodium falciparum* donde se suministró amodiaquina (tableta de 150 mg base), dosis total de 25 mg/kg en tres días; más SDX-PYR (tabletas de 50 mg base de SDX/25 mg de PYR), en dosis única, 25 mg/kg de SDX y 1 mg/kg de PYR; más primaquina (tabletas de 15 mg) dosis única de 0.75 mg/kg de peso; producían efectos significativos al favorecer el aumento de la hemoglobina, y el retinol, y por otro lado, la disminución de la proteína C y la ferritina. Mostrándose algunas similitudes con el presente estudio en lo referente con los niveles de hemoglobina, en los primeros 30 días de tratamiento(90). Datos similares se reportaron de niveles menores de 10 g/dL en la investigación realizada sobre eficacia terapéutica de la SDX-PIR, y cloroquina (CQ) en el tratamiento de la malaria, en Burkina Faso en 2006(88).

Al analizar los datos obtenidos del estudio se encontró una distribución normal, los parámetros estadísticos a emplear son los que se aplican a pruebas con distribución normal, como *t student*, *F*, etc, además, *Shapiro Will* dio no significativo, o sea que la distribución es normal. El *r* demostró una dependencia o correlación muy baja. Lo cual, no permite concluir un comportamiento que sea evidencia de alguna manera de correlación entre las variables IgG vs Hb, como se puede ver de alguna forma en la gráfica de IgG vs Hb, en los primeros meses de infección de los niños. Aunque estadísticamente no hay significancia, posiblemente, pueda existir algún tipo de relación, ya que probablemente se



emplearon muy pocas muestras que no permiten hacer un análisis mas completo y confiable. De igual forma, la variación de IgG libre en la sangre es muy alto, e independientemente de la cantidad promedio encontrada con base en la edad de los niños, estos valores no corresponden a un aumento progresivo en la dosificación, ya que esta fue igual para todos los pacientes, sino que varía con cada paciente dentro un cierto rango entre 0,0 por no tener tratamiento hasta un valor tan alto como 400 mg.

### **5.3.3 Correlación Hb vs título de IgG**

Con el siguiente análisis se pretendió realizar una apreciación del comportamiento y la existencia de algún tipo de relación causa-efecto en lo concerniente con los niveles de Hb frente a un incremento importante de los anticuerpos específicos para TC, cuando se presentó la parasitosis en los niños objeto de estudio. De lo cual, se pudo establecer que los datos obtenidos presentan una distribución normal, según el test de normalidad *Shapiro Will*. Igualmente, tanto el test *t- Student*, como el ANOVA no mostraron una relación significativa, entre ambas variables, sería importante hacer otros estudios donde se analice en mayor medida dicha apreciación.



Tabla 34. Variación del nivel de Hemoglobina (Hb) vs nivel de inmunoglobulina (IgG) en suero.

MUESTRAS.	EDAD (meses)	Hb (g/dL)	SD	%RSD	IgG	SD	%RSD
1	2,0	10,9	6,11256	44,13	282	97,46794	34,56
2	3,0	9,80	2,35867	24,15	349,7	61,04370	17,46
3	4,0	10,0	-	-	143	7,07107	4,95
4	5,0	10,2	-	-	186	-	-
5	6,0	10,8	0,91652	8,49	224	200,3072	89,42
6	8,0	11,55	0,63639	5,51	41	-	-
7	9,0	11,0	1,4	12,73	0	-	-
8	13,0	12,0	-	-	10	-	-
9	18,0	13,0	-	-	464	-	-
10	22,0	12,8	-	-	355	-	-
11	24,0	13,6	-	-	99	-	-
Parámetros Estadísticos.	Valor						
N		11	-	-	11	-	-
Promedio		11,4227	-	-	195,7909	-	-
I.C. inferior		10,5606	-	-	-	-	-
I.C. superior		12,2848	-	-	-	-	-
(SD)		±1,2832	-	-	±154,3577	-	-
W		0,48314	-	-	0,64901	-	-
Valor de P		0,9367	-	-	0,9504	-	-
r	0,0818						
Significancia		ns	-	-	ns	-	-

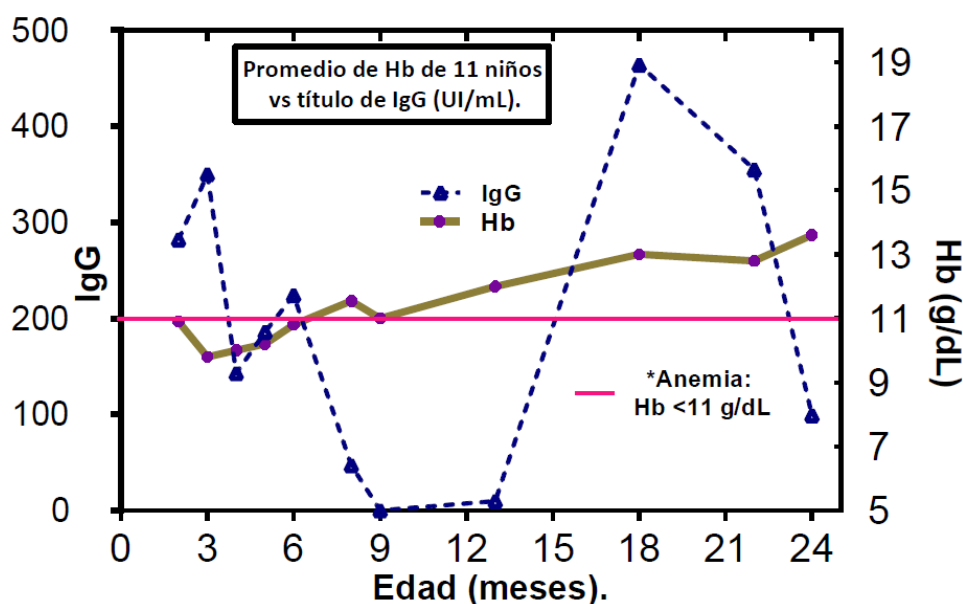


Figura 43. Variación del nivel de Hemoglobina (g/dL) vs IgG (UI/mL).

De la gráfica anterior, se podría inferir que en los primeros meses se presenta una disminución de Hb por avance de la enfermedad, con unos correspondientes títulos de IgG indicativos de la infección particularmente altos; que estadísticamente no muestran una correlación directa ( $r = 0,0818$ ), lo que indica que posiblemente el comportamiento observado en la gráfica ocurra por causas diferentes; sin embargo, dicho comportamiento muestra algunos indicios de los efectos que se producen en la TC.

### 5.3.4 Correlación nivel de IgG vs SDX residual

Una vez leídas las muestras en el equipo, se procedió a correlacionar y establecer el análisis pertinente a las muestras del estudio. Es importante mencionar que por las condiciones de trabajo experimental, y disponibilidad de muestras, en todas las muestras no fue posible hacer los análisis cromatográficos por duplicado; sin embargo, en las muestras que se logró realizar repeticiones, los datos arrojaron una alta precisión.

### 5.3.4.1 Respuesta Terapéutica tratamiento (SDX-PIR) Falcidar, paciente A

Tabla 35. Concentración de SDX en suero vs Nivel de IgG. Paciente A.

Fecha	Edad (meses)	IgG (UI/mL)	SDX ( $\mu\text{g/mL}$ )	Dosis (mg)	S.D.	%RSD	Síntomas(si/no)
27/04/2006	13	24	30,251	200	0,571554	1.89	no
30/05/2006	14	0.0	8,553	200			no
25/07/2006	16	2,2	30,506	200			no
02/11/2006	20	0.0	17,978	200			no
21/02/2007	23	8,7	2,527	*0			no
22/04/2009	49	48,9	0,256	*0			no

\* Suspensión del tratamiento.

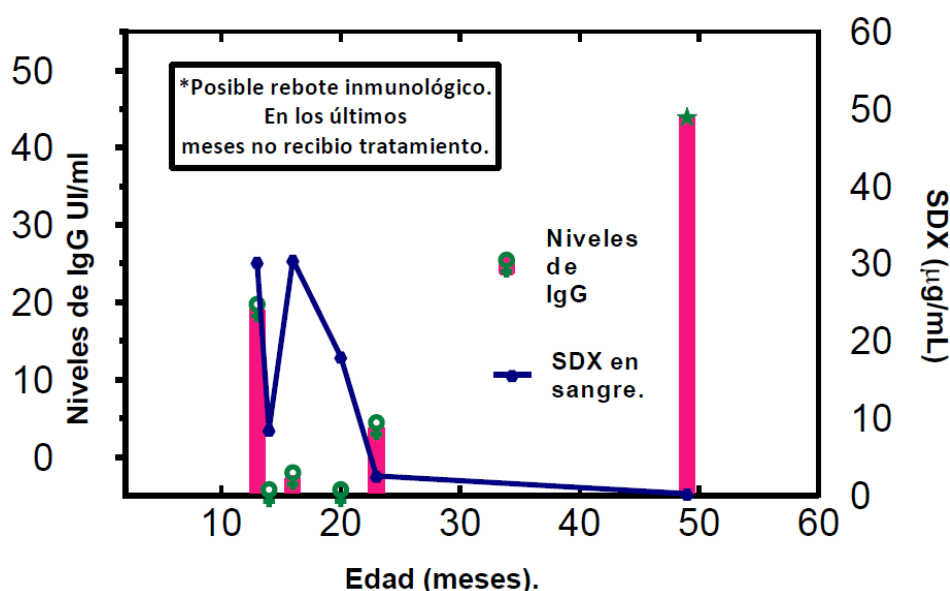


Figura 44. Variación del nivel de IgG vs. SDX. Paciente A.

Con base en los datos obtenidos se puede inferir que posiblemente al inicio de la infección por *Toxoplasma* se observa un aumento significativo en los anticuerpos IgG específicos para toxoplasmosis como evidencia de la parasitosis, que en concordancia con el inicio del tratamiento suministrándose SDX-PYR, con una adecuada respuesta del sistema inmunológico se comience una evolución positiva en el tratamiento, con la posterior disminución de anticuerpos varios meses después. Para el paciente A, en particular se observó una disminución





gradual del nivel de anticuerpos teniendo en consideración que el paciente recibió dosis del comprimido de Falcidar equivalentes a 200 mg de SDX. Resulta particular el hecho de que un seguimiento tan prolongado en el tiempo (49 meses) al suspender el tratamiento por considerarse superado, nuevamente se incrementan en gran medida el nivel de anticuerpos (IgG), lo que posiblemente podría interpretarse como un “*Serological Rebound*” expresión inglesa a lo que se conoce como un rebote inmunológico, definido como: el cambio de los niveles de IgG que ha estado estable con valores < 50 UI/mL luego de dos muestreos consecutivos, a valores > 100 UI/mL (91), otro estudio hace referencia al mismo comportamiento inmunológico pero con una diferencia en el rango establecido: niños con niveles < 60 UI/mL con TC estable, a valores > 200 UI/mL en un periodo de 12 meses (92).

Es importante mencionar que ambos estudios hacen referencia a que este comportamiento es más común de lo que se cree, pero que es poco el conocimiento científico que se tiene al respecto, que si bien, se han adelantado estudios intentando un acercamiento al entendimiento de los fenómenos biológicos que se suceden; donde incluso experimentalmente se ha encontrado un incremento importante de la IgE y la aparición de la citoquina Th2 como un posible factor desestabilizante de la TC y probablemente en la reactivación parasitaria(92). Por tanto, según el reporte de los franceses no podríamos afirmar con certeza, que este paciente presentara episodios de rebote inmunológico, por presentarse un valor IgG de 48,9UI/mL.

El análisis estadístico mostro un  $r = 0,3317$ , mostrando una ligera correlación, al tener un valor de significancia muy cercano a ser aceptado.

5.3.4.2 Respuesta Terapéutica tratamiento (SDX-PIR) Falcidar, paciente B: A diferencia de los datos anteriores, los niveles encontrados en el paciente B de IgG son mucho mayores de 200 UI/mL, si bien, no se enmarcan dentro de la definición establecida en el sentido de evidenciarse un cambio significativo del nivel de IgG, si se observa unos valores en el tiempo, aproximadamente 18 meses, (con un intervalo de 9 meses sin datos de seguimiento), que

probablemente se podrían interpretar con un rebote inmunológico, ya que incluso, los estudios reportan que este fenómeno puede ocurrir al inicio del tratamiento, y después de ser suspendido. Resulta ser importante los reportes que indican que luego de la ocurrencia de un rebote inmunológico, un tratamiento luego del rebote inmunológico con SDX-PYR no es necesario para evitar aparición de nuevas lesiones retíneas (91).

Tabla 36. Concentración de SDX en suero vs Nivel de IgG. Paciente B.

Fecha	Edad(meses)	IgG(UI/mL)	SDX (µg/mL)	Dosis(mg)	Sintomatología(si / no)
13/08/2009	1	393	0	100	No
10/09/2009	2	413	0	125	No
21/10/2009	3	412	15	125	No
18/01/2010	6	407	21	150	No
03/03/2010	8	372	20	400	No
08/04/2010	9	384	6	400	no
28/03/2011	18	464	0	0	no

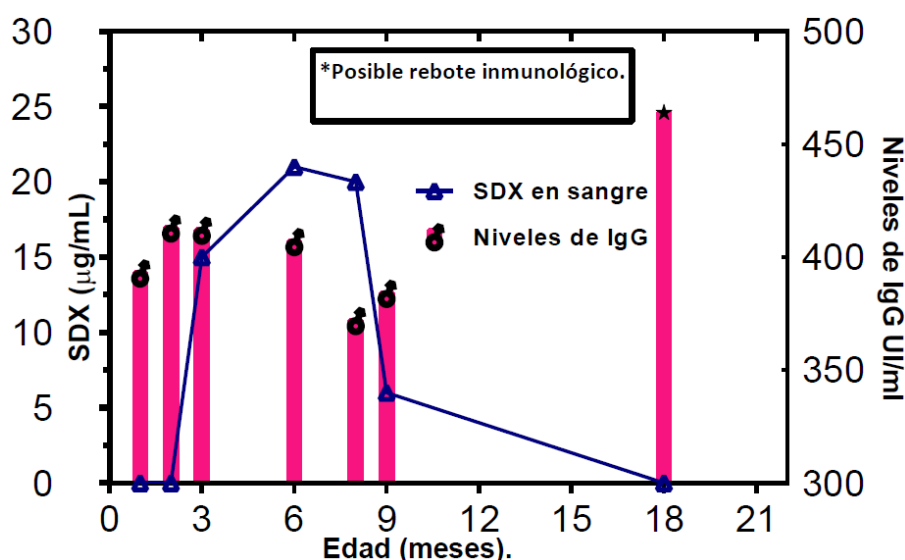


Figura 45. Variación del nivel de IgG vs. SDX. Paciente B.

En el paciente B se observa un elevado nivel de anticuerpos IgG en la prueba serológica de 393 UI/mL en el mes 1, lo que indica claramente la presencia del parásito, y es imperativo el inicio de tratamiento, para lo cual, se suministró una



dosis de carga de 100 mg/kg/día, aumentando la dosis hasta llegar a los 400 SDX ( $\mu\text{g/mL}$ ) en un periodo de 8 meses. Durante este tratamiento poca evidencia de disminución de anticuerpos se observó, y más aún, en el mes 18 se observó un aumento muy significativo del nivel de anticuerpos de IgG superior al 20% (464 UI/mL), dando serios indicios de ser interpretado como rebote inmunológico. Aunque el comportamiento y respuesta terapéutica entre ambos paciente tiene gran diferencia se podría indicar que así en el paciente B los niveles de anticuerpos no disminuyeron ostensiblemente, y permanecieron muy elevados por encima de 350 UI/mL, la suspensión del tratamiento sin hacer una evaluación posterior de los anticuerpos, posiblemente incida en muchos casos a reactivar la infección. Dicho análisis no tiene en consideración la respuesta del sistema inmune del paciente, y más aún sin tener en consideración la variabilidad interindividual que resulta ser un factor determinante.

Es importante mencionar que el análisis estadístico mostró un  $r$  (Pearson) = - 0,4267, que evidencio una baja correlación entre ambas variables, sin embargo, el resultado fue consistente, mostrando que posiblemente si exista algún tipo de correlación que este determinado no solamente a la SDX, sino a su asociación con otros factores difíciles de caracterizar, y que están más allá del alcance de los análisis de estudio.

El motivo de la escogencia de los pacientes A y B, obedeció al contraste en la respuesta terapéutica en lo referente a los niveles de anticuerpos IgG, que sin embargo, en el tiempo presentaron un cambio drástico de la respuesta inmunológica, y por la imperante necesidad de suministrar medicación para el control del parasito en el organismo, y la ocurrencia de las nefastas consecuencias para los niños, y su futuro desarrollo psicomotriz.

De igual forma, posiblemente la farmacocinética de los medicamentos en neonatos, niños y adultos sea diferente y el sistema inmuno-enzimático juegue un papel determinante en la asimilación, acumulación y eliminación de los medicamentos.



### 5.3.5 Estabilidad de las tabletas de Falcidar (SDX-PYR) comerciales

Es importante indicar que las tabletas utilizadas de la marca ROCHE, fue un medicamento vencido, guardado a temperatura ambiente durante varios años, que luego se empleó para contrastar la señal dada por el estándar de SDX con el correspondiente principio activo pero del medicamento comercial Falcidar, en suero y en fase móvil (metanol).

Tabla 37. Porcentajes de recuperación y tiempos de retención, para análisis de estabilidad de los fármacos en tabletas de Falcidar comercial.

MUESTRA (CH)**	[ ] adicionada de Falcidar (µg/mL)	[ ] Hallada ug/mL	%RSD	% R	Tiempo de retención (t <sub>r</sub> )
CH + 5	5	5.598	7.979	111.96	11.376
CH + 10	10	9,014	7.334	90.14	11.380
CH + 30	30	23.423	17.411	78.077	11.515
CH + 50	50	38.515	18.342	77.030	11.491
CH + 62.5	62.5	55.206	8.764	88.330	11.495
*Falcidar estándar.	20	14.279	23.603	73.95	11.463
% RSD. Promedio			13.906		
% R. Total.				86.581	
%RSD.de tr.					0.530
*Muestra sin tratamiento, lectura directa.** CH, suero control negativo al que se adiciono el medicamento Falcidar.					

Los resultados obtenidos muestran un %RSD aceptable, un % R del fármaco alto, y un t<sub>r</sub> con un %RSD muy bajo, lo que indica una alta especificidad del sistema por el analito, alta estabilidad y baja degradación o derivatización en otro compuesto del fármaco SDX en el medicamento FALCIDAR. (Sin embargo, no se realizaron estudios sobre la actividad (potencia) de los antibióticos, ya que ésta se demuestra por su efecto inhibitor sobre los microorganismos (69), para poder determinar cambios en el efecto terapéutico vs tiempo de almacenamiento y fecha de vencimiento de los Fármacos).



### 5.3.6 Incidencia de la matriz de disolución

Teniendo en consideración que para el presente método de implementación no se empleó estándar interno, la determinación del efecto matriz no se pudo hacer, sin embargo, el empleo de muestras de plasma y suero dopadas con los fármacos que muestran buenos porcentaje de recuperación, por ejemplo del  $86.581 \pm 13.906$ , para suero dopado con Falcidar, del  $87,06 \pm 7,318$  para suero dopado con estándar de SDX, muestran cierta congruencia en los resultados obtenidos.

Por lo tanto, se realizaron ensayos de curvas de calibración en diferentes matrices comparando las pendientes de las gráficas obtenidas, y realizando análisis estadísticos de la prueba *t-Students*, y *F*, donde se evidencian valores similares. Sin embargo, analizando el %RSD, se evidencia una gran diferencia respecto a la pendiente de las curvas patrón de SDX y SDZ comparada con una curva preparada en fase móvil (metanol), y en condiciones cromatográficas diferentes. Al realizar la comparación de la pendiente entre la curva patrón de SDX en suero, y SDX pero del medicamento comercial (Falcidar), se evidencio un %RSD, muy alto (21.931), teniendo en consideración que se evaluó en matriz de suero.

Resulta importante aclarar que en el ensayo realizado para la determinación de la incidencia de la matriz de disolución, el número de datos en todas las curvas no eran los mismos, y en las curvas de plasma y Falcidar, no se realizaron repeticiones.



Tabla 38. Incidencia de la matriz de disolución del método SDX/suero.

[ ] (µg/mL)	SDX/Suero	SDX / Metanol-2	SDX/Plasma.	Falcidar (SDX)/Suero	SDX / Metanol-1
0,2	136092,8	30952	100546	126713	46319
0,5	136227,9	62862	-	750322	85524
1	236839,5	120236	-	-	236839,5
2	437325,4	295465	403705	-	397802
5	913801,6	649031	-	-	1005983
10	-	-	1973796	-	-
20	-	-	3941904	-	-
30	6608400	4254166		5319059	-
50	11545430	6872123	10703620	8772250	10056950
-	-	-	-	-	-
<b>Pendiente de cada recta (b).</b>	228801,14	138556.95	213637,7	167364,79	201037.36
<b>% RSD<sup>c</sup></b>	-	34.741 <sup>a</sup>	4.847	*21.931	9.135
<b>Coefficiente de correlación ( r )</b>	0,99947	0.9995	0.998	0.99486	0.9999
<b>F<sub>calculado</sub><sup>c</sup></b>	-	2,728776097	1,066782055	1,213224862	1,274039237
<b>F<sub>crítico</sub><sup>c</sup></b>	-	4,283865714	6,163132283	8,940645121	4,950288069
<b>Criterio de aceptación.</b>	<b>F<sub>cal</sub> &lt; F<sub>tab</sub>, Ho= 0.<sup>d</sup></b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>
<b>t<sub>calculado</sub><sup>c</sup></b>	-	0,556824621	-0,21794763	-0,323477263	0,374226315
<b>t<sub>crítico</sub> ( 2 colas)<sup>bc</sup></b>	-	2,178812827	2,228138842	2,262157158	2,200985159
<b>Nivel de significancia:</b>	<b>t<sub>cal</sub> &lt; t<sub>crit</sub></b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

<sup>a</sup>%RSD. significativamente alto. <sup>b</sup>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales. (Excel). <sup>c</sup>Las determinaciones %RSD, t y F, se realizaron en comparación a la curva patrón de SDX en suero. <sup>d</sup>No hay diferencia significativa entre las desviaciones estandar.

Tabla 39 Incidencia de la matriz de disolución del método SDZ/suero

[ ] (µg/mL)	SDZ/Suero	SDZ/Metanol-2	SDZ/Metanol-1.
0,2	70793,3	-	38170
0,5	101597,1	62862	103856
1	247885,9	120236	-
2	463400,5	-	421194
5	1270806	482632,5	1069730
10	-	-	-
20	-	-	-
30	7575285	4254166	-
50	13148970	8493409	10599250
-	-	-	-
<b>Pendiente de cada recta (b).</b>	261191,29217	167276,44023	212003,18123
<b>%RSD.<sup>c</sup></b>	-	<sup>a</sup> 30.998	14.700
<b>Coefficiente de correlación ( r )</b>	0,99978	0,99535	0,99998
<b>F<sub>calculado</sub>.<sup>c</sup></b>	-	1,925368265	1,252975407
<b>F<sub>crítico</sub>.<sup>c</sup></b>	-	6,163132283	6,163132283
<b>Criterio de aceptación</b>	<b>F<sub>cal</sub> &lt; F<sub>tab</sub>, Ho= 0<sup>d</sup></b>	n.s.	n.s.
<b>t<sub>calculado</sub><sup>c</sup></b>	-	0,217300626	0,285847337
<b>t<sub>crítico</sub> ( 2 colas)<sup>bc</sup></b>	-	2,228138842	2,228138842
<b>Nivel de significancia.</b>	<b>t<sub>cal</sub> &lt; t<sub>crit</sub></b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

<sup>a</sup>%RSD. Significativamente alto. <sup>b</sup>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales. (Excel). <sup>c</sup>Las determinaciones %RSD, t y F, se realizaron en comparación a la curva patrón de SDZ en suero. <sup>d</sup>No hay diferencia significativa entre las desviaciones estandar.

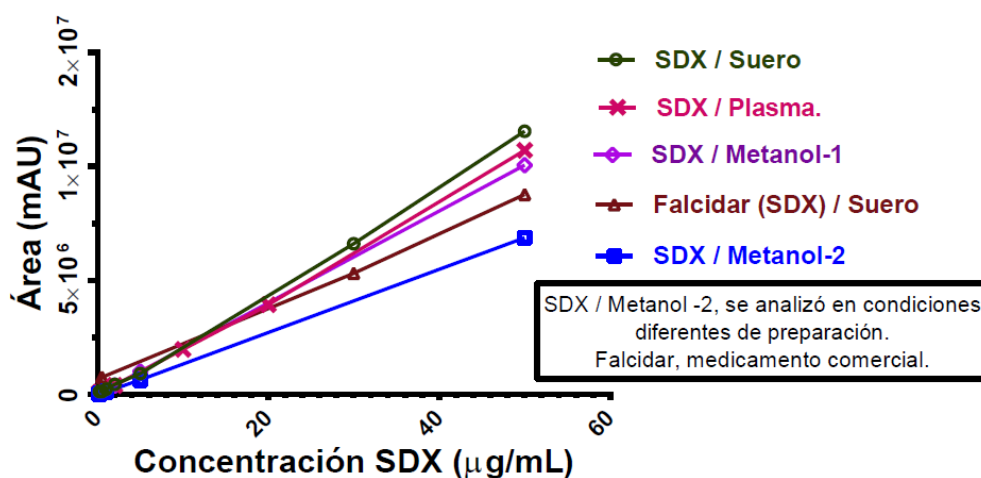


Figura 46. Rectas de calibración para estándares de sulfadoxina (SDX) en matrices diferentes.

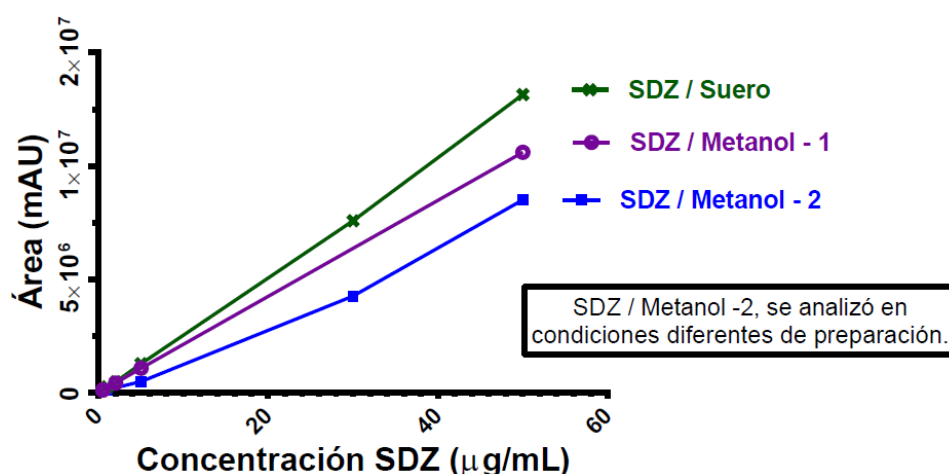


Figura 47. Rectas de calibración para estándares de sulfadiazina (SDZ) en matrices diferentes.

Analizando las curvas de la figura 46, se puede observar que se presenta relativamente poca variación entre las pendientes de las curvas de calibración de SDX patrón en suero, plasma y metanol-1, con %RSD inferiores al 10%, lo que no ocurrió con las curvas en metanol-2, y con SDX pero del Falcidar, que mostraron %RSD superiores al 20%. Lo cual podría ser indicio de la posibilidad de realizar análisis en las matrices mencionadas, que sin embargo, buscando





precisión y exactitud en el método probamente lo más apropiado estadísticamente sea realizar los análisis en una matriz similar al de las muestra de estudio, resultando importante ampliar estos ensayos.

Respecto al analisis de las curvas patron de SDZ, no fue posible realizar similares mediciones en plasma, ni con el medicamento Falcidar, ya que este no es principio activo del mismo. Sin embargo, se intento realizar un estimativo frente a curvas preparadas en metanol en epocas diferentes, mostrando gran variabilidad aun en la medicion que se realizo en las mismas condiciones de la curva de SDZ en suero, con valores %RSD superiores al 14%. Siendo, posiblemente no apropiado realizar los analisis de SDZ en curvas en metanol. Sin embargo, debido a las pocas muestras de analisis, la no realizacion de repeticiones en las mediciones, y al no emplearse un estandar interno, estadisticamente los resultados obtenidos, no sean determinantes para una conclusión; y se requiera igualmente realizar ensayos muchos más estructurados y ampliados.



# **CAPÍTULO 6**

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**



Se implementó adecuadamente y bajo las condiciones locales una metodología cromatográfica para la determinación en suero sanguíneo, de 2 de los fármacos más empleados en el tratamiento contra la TC, como son la SDX y SDZ, por RP-HPLC-DAD empleando metanol como fase móvil, que mostró ser muy apropiado en todo el proceso, aun cuando los fármacos son poco solubles en él, y por la simpleza de la fase móvil, en la cual, solo se mezclaba con agua, y acidificaba con ácido fórmico, y por su menor toxicidad en comparación con otros solventes.

Mediante la determinación de los atributos de calidad establecidos, se pudo confirmar la confiabilidad y sensibilidad del método para las sulfonamidas analizadas (SDX y SDZ), a un nivel de  $\mu\text{g/mL}$ , en suero sanguíneo.

Se aplicó la metodología desarrollada a muestras de suero almacenadas en un periodo aproximado de entre 2 y 10 años, mostrando alta sensibilidad del método.

Se logró establecer algunas aproximaciones en la respuesta terapéutica de la TC, bajo las condiciones experimentales locales.

Por lo anterior, el método desarrollado se constituye, en un instrumento apropiado, preciso y confiable, en el área de la Química Analítica Instrumental, que ofrece la posibilidad de identificar y cuantificar simultáneamente los fármacos SDX y SDZ empleados en el tratamiento de la TC, de manera fácil y rápida, sin generar impactos ambientales nocivos.

Para la realización de posteriores trabajos en el tema, se recomienda la optimización en las condiciones experimentales para la determinación simultánea de la PYR, ya que este fármaco se constituye en el complemento sinérgico de las sulfas (SDX y SDZ) entre otras, para el tratamiento de la TC, y su seguimiento farmacocinético resulta fundamental. También es pertinente ampliar el análisis a otras sulfas, y considerar el factor de degradación en el tiempo de los fármacos en las muestras almacenadas bajo un modelo bioestadístico.



Igualmente, resulta indispensable la optimización de la metodología para la determinación de la incertidumbre del método, ya que todo método cromatográfico trae implícita una incertidumbre, debida al instrumento, a las condiciones de trabajo del mismo, al analista y a otros factores que aportan a la incertidumbre total de la metodología.



# **CAPÍTULO 7**

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Carmona J, Pabon A, Marquez D, Lopez C, Morales G, Blair S. [Blood levels of sulfadoxine and pyrimethamine, according to the malaria-treatment response, in two municipalities of Antioquia, Colombia]. *Rev Panam Salud Publica*. 2005 Aug;18(2):75-83.
2. Trenque T, Simon N, Villena I, Chemla C, Quereux C, Leroux B, et al. Population pharmacokinetics of pyrimethamine and sulfadoxine in children with congenital toxoplasmosis. *Br J Clin Pharmacol*. 2004 Jun;57(6):735-41.
3. Giraldo A, Fonseca D, Lozano F, Orjuela J, Gutiérrez A, Ruiz A. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de toxoplasma gondii en líquido amniótico. Hallazgos en 534 casos estudiados en la fundación gillow. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* [serial on the Internet]. 2001 [cited 15 abr 2013]; Vol. 52 No. 1: Available from: <http://www.fecolsog.org/revista/revista.php>.
4. Salvia MD, Álvarez E, Bosch J, Goncé A. Infecciones congénitas. *Asociación Española de Pediatría* [serial on the Internet]. 2008: Available from: [http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/20\\_0.pdf](http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/20_0.pdf).
5. Universia. Uniquindío coordinará estudio nacional en toxoplasmosis neonatal. *Revista Universia* [serial on the Internet]. 2009 [cited 2013 may 18]: Available from: <http://noticias.universia.net.co/vida-universitaria/noticia/2009/02/02/238852/uniquindio-coordinara-estudio-nacional-toxoplasmosis-neonatal.html>.
6. Gómez A, Quaranta A, Pirola M, Quaranta T. TOXOPLASMOSIS: sus formas clínicas. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina - N° 165 – Enero 2007* [serial on the Internet]. 2007; 165: Available from: [http://med.unne.edu.ar/revista/revista165/4\\_165.pdf](http://med.unne.edu.ar/revista/revista165/4_165.pdf).
7. Gómez Marín JE. Posibilidades de un Programa de Control Nacional de la Toxoplasmosis Congénita. *Revista de Salud Pública*. 2002;4:50-5.
8. Reunión de Investigadores de la OMS sobre Toxoplasmosis (1968 : Ginebra S, Organization WH. Toxoplasmosis : informe de una reunión de investigadores de la OMS Ginebra1969 [updated 2013 may 18; cited 431]; 33]. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_431\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_431_spa.pdf).
9. OMS. Guías para la calidad del agua potable 2006. Available from: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwg/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwq3_es_full_lowres.pdf).
10. Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*. 2005 Sep-Oct;52(5):399-451.
11. Martín-Hernández I. Toxoplasmosis congénita: unamirada al problema. *Rev Biomed* 2004;15:181 - 90.
12. Quintero L. Sistema de Vigilancia Epidemiológica en Toxoplasmosis: Definición de Caso y Notificación. *Revista de Salud Pública*. 2002;4:29-30.
13. INFOSAN. Inocuidad de los alimentos y nutrición durante el embarazo y la lactancia. *Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos*. 2008;3:7.
14. Jácome Torres J. Prevalencia de infección por *Toxoplasma Gondii* en mujeres embarazadas, en Valledupar, Cesar año 2007 [Trabajo de grado]. Bogotá D.C: Universidad del Magdalena 2007.
15. Vignau ML, Venturini LM, Romero JR, Eiras DF, Basso WU. *Parasitología Práctica y Modelos de Enfermedades Parasitarias en los animales domésticos*.



La Plata 2005. Available from: <http://www.slideshare.net/nelu36v/parasitologia-practica-y-modelos-de-enfermedades-parasitarias-en-los-animales-domesticos>.

16. Derouin F, Chastang C. Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988 Mar;32(3):303-7.
17. Corvaisier S, Charpiat B, Mounier C, Wallon M, Leboucher G, Al Kurdi M, et al. Population pharmacokinetics of pyrimethamine and sulfadoxine in children treated for congenital toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Oct;48(10):3794-800.
18. Mack DG, McLeod R. New micromethod to study the effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii*: comparison of sulfadoxine and sulfadiazine individually and in combination with pyrimethamine and study of clindamycin, metronidazole, and cyclosporin A. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984 Jul;26(1):26-30.
19. Bernardo GF. Estudio analítico de sulfamidas, compuestos asociados y productos de degradación mediante nuevos métodos de separación. Ciudad Real: Universidad de castilla-la mancha; 2001.
20. Campuzano Maya G. Toxoplasmosis: un problema cada vez mayor. *Medicina & Laboratorio*, Volumen 14, Números 7-8, 2008. 2008;Volumen 14, (7-8):309-10.
21. Gómez Marín JE. Toxoplasmosis: Un problema de Salud Pública en Colombia. *Revista de Salud Pública*. 2002;4:7-10.
22. Cué Brugueras M, Morejón García M. Antibacterianos de acción sistémica: Parte III. Sulfonamidas y tetraciclinas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 1999;15:156-67.
23. Zytkevich TH, Salter J, Hennigan L, Timperi R, Maguire J, Hoff R. Isocratic reversed-phase HPLC method to measure pyrimethamine extracted from plasma of infants treated for toxoplasmosis. *Clin Chem*. 1991 Jul;37(7):1281-3.
24. Márquez Fernández DM, Pabón Vidal AL, López Córdoba CA, Blair Trujillo S. Validation of a liquid chromatographic method for determination of sulphadoxine and pyrimethamine in whole blood spotted on filter paper. *Revista Cubana de Farmacia*. 2012;46:311-9.
25. Gómez Marín JE. Tratamiento de la Toxoplasmosis: Esquemas para la Forma Congénita y en el Inmunesuprimido. *Revista de Salud Pública*. 2002;4:35-42.
26. Rosso F, Agudelo A, Isaza Á, Montoya JG. Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. *Colombia Médica*. 2007;38:316-37.
27. García F, Vázquez L, Sarubbi MA. Toxoplasmosis. *Guía de Prevención y Tratamiento de las Infecciones Congénitas y Perinatales*. Buenos Aires 2010. p. 208.
28. Montoya M, Gómez Marín J, Loango N, Castaño J, Marx C, Foudrinier F, et al. Utilidad de dos pruebas serológicas para IgA humana antitoxoplasma como pruebas de referencia para toxoplasmosis materna reciente. *Acta Médica Colombiana* 1998;23:275-82.
29. Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Apr;25(2):264-96.



30. Montoya MT, Gómez Marín JE, Castaño JC, Marx C, Aubert D, Bonhomme A, et al. Avances diagnósticos en toxoplasmosis. ACTA MÉDICA COLOMBIANA. 1996 Mayo-Junio;21(3).
31. Pantoja Ramos A, Pérez García L. Reseña histórica acerca de las investigaciones relacionadas con la toxoplasmosis. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2001;53:111-7.
32. Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 11;104(37):14872-7.
33. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jul 25;103(30):11423-8.
34. Walzer KA, Boyle JP. A single chromosome unexpectedly links highly divergent isolates of *Toxoplasma gondii*. mBio. 2012;3(1).
35. Ovalle F, García A, Thibauth J, Lorca M. Frecuencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de Valdivia, Chile. Boletín chileno de parasitología. 2000;55:94-9.
36. Nobelprize.org. Alphonse Laveran - Biographical. 2013; Available from: <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1907/laveran-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1907/laveran-bio.html)>.
37. Díaz L, Zambrano B, Chacón G, Rocha A, Díaz S. Toxoplasmosis y embarazo. Rev Obstet Ginecol Venez. 2010;70(3):190-205.
38. Dubey J, Lindsay D, Speer C. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998;11:267-99.
39. COGNITION FIFHAM. Ciclo Biológico *Toxoplasma Gondii* 2013; Available from: <http://www.ihmc.us/contact.php>.
40. Gómez Marín JE. Evaluación del tratamiento de la toxoplasmosis gestacional en una cohorte colombiana INFECTIO. 2005;9(1):8.
41. Andréu LM. TOXOPLASMOSIS: DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO EN LAS GESTANTES. SEIMC.6.
42. Mondragón Flores R, González del Carmen M, Fernández NR. Papel del hierro y proteínas relacionadas en *Toxoplasma gondii*. In: Cinvestav, editor. La Lucha por el Hierro Patógeno vs Hospedero. 1 ed. México D.F.2010. p. 32.
43. Usach. E. Toxoplasmosis. 2011.
44. LOPEZ V J, ARRUBLA V J, GUERRERO G. ESTANDARIZACION DE ANALISIS DE METILESTERES DE ÁCIDOS GRASOS POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS. Scientia Et Technica. 2009;XV:228-33.
45. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998 Apr;11(2):267-99.
46. Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009 Sep 27;364(1530):2749-61.
47. Morrissette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Mar;66(1):21-38; table of contents.





48. Bocanegra García I, Perea Remujo JA, Almería de la Merced S. Situación actual de la toxoplasmosis porcina en España: revisión de recientes estudios seroepidemiológicos. SUIIS 2011;Nº 77, .
49. De Paz González L. Toxoplasmosis. maternofetal•net [serial on the Internet]. 2010: Available from: <http://www.maternofetal.net/6toxoplasmosis.html>.
50. Gómez Betancourt R. Toxoplasmosis. Maternofetalnet2010.
51. Gómez Marín JE. Toxoplasmosis:Avances recientes y Guías de atención [Presentación Power Point]. In press 2012.
52. de-la-Torre A SM, Curi A, Jaffe GJ, Gomez-Marin JE. Therapy for ocular toxoplasmosis. Ocular Immunology and Inflammation. 2011.;19 (5):314-20.
53. Olaya Urueña CA FGD. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA PARA DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA TOXOPLASMOSIS GESTACIONAL. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2003;54(3):164-70.
54. Díaz L, Zambrano B, Chacón G, Rocha A, Díaz S. Toxoplasmosis y embarazo. Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela. 2010;70:190-205.
55. Cortés JA, Gómez JE, Silva PI, Leonardo. A, Arévalo Rodríguez I, Alvarez MI, et al. Guía de atención integral para la prevención, detección temprana y tratamiento de las complicaciones del embarazo, parto y puerperio: sección toxoplasmosis en el embarazo. INFECTIO. 2012.;16.(4.):230-46.
56. Durlach R, Kaufer F, Carral L, Freuler C, Ceriotto M, Rodríguez M, et al. Consenso argentino de toxoplasmosis congénita. Medicina (Buenos Aires). 2008;68:75-87.
57. Picazo JJ, Fuertes Ortiz de Urbina A. Toxoplasma gondii Protocolos de Diagnóstico Serológico Clínico (DSC) 1998.;1.
58. Sierra M, Bosch J, Juncosa T, Matas L, Muñoz C, Andreu A, et al. Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*. CCS SEIMC. 1998.;35.
59. OMS. Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias. 2 ed1996. p. 160.
60. Baquero-Artigao F, del Castillo Martin F, Fuentes Corripio I, Gonce Mellgren A, Fortuny Guasch C, de la Calle Fernandez-Miranda M, et al. [The Spanish Society of Pediatric Infectious Diseases Guidelines for the diagnosis and treatment of congenital toxoplasmosis]. An Pediatr (Barc). 2013 Aug;79(2):116 e1- e16.
61. OMS. Modelo OMS de Información para la Prescripción de Medicamentos: Medicamentos Utilizados en las Enfermedades Parasitarias. España1991. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/h2924s/h2924s.pdf>.
62. Osorio JR. Colciencias aprueba proyecto en Toxoplasmosis Neonatal. Colombia para Todos net [serial on the Internet]. 2008: Available from: <http://www.colombiaparatodos.net/noticias-colombia-para-todos-articulo-colciencias-aprueba-proyecto-en-toxoplasmosis-neonatal-seccion-politica.htm>.
63. Ciudad de México2008. Diccionario de Infectología y Microbiología Clínica.
64. SIGMA-ALDRICH. Sulfadiazine.
65. Laurence L. B, John S. L, Keith L. P. Section VIII: Chemotherapy of Microbial Diseases. . In: Companies M-H, editor. Goodman y Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics2001. p. 1825.
66. Vives EA, Ventriglia MV, Medvedovsky D, Rothlin R. Quimioterápicos inhibidores de la síntesis de ácido tetrahidrofólico. Farmacología II2004. p. 11.



67. Peters PJ, Thigpen MC, Parise ME, Newman RD. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf.* 2007;30(6):481-501.
68. Berzas Nevado JJ, Castaneda Penalvo G, Guzman Bernardo FJ. Simultaneous determination of sulfaquinoxaline, sulfamethazine and pyrimethamine by liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2000 Feb 18;870(1-2):169-77.
69. A.E.F.I., editor. Validación de Métodos Analíticos. A.E.F. Industria, España. ed. Barcelona Sección Catalana.2001.
70. Quattrocchi O AdAS, Laba R. Aplicación y Práctica, validación de métodos. In: S.A AG, editor. Introducción a la HPLC. Buenos Aires, Argentina1992. p. 301–28.
71. FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001:1-25.
72. ICH harmonised tripartite guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005;4:17.
73. Alonso MA ÁJ, Arroyo J, Ávila L, Aylón R, Gangoso A, Martínez H, Mateo C, Morera T, Pérez A, Rodríguez C, Saiz LC, Sevillano ML, Siguín R. ADHERENCIA TERAPÉUTICA: ESTRATEGIAS PRÁCTICAS DE MEJORA. *Salud Madrid.* 2006;13(8).
74. Schmidt DR, Høgh B, Andersen O, Hansen SH, Dalhoff K, Petersen E. Treatment of infants with congenital toxoplasmosis: tolerability and plasma concentrations of sulfadiazine and pyrimethamine. *Eur J Pediatr.* 2006 Jan;165(1):19-25.
75. Fernandez L, J. Comparison Guide to C18 Reversed Phase HPLC Columns.2008.; 4: Available from: <http://www.mac-mod.com/pdf/technical-report/MMA036-ColumnComparisonGuide.pdf>.
76. POZO K J, MANQUIAN T N, C. N, T. M. Evaluación de un método de análisis de residuos de sulfamidas, en miel, por cromatografía líquida de alto rendimiento. *Agro sur [online].* 2004;32(2).
77. Johannessen JK, Christiansen I, Schmidt DR, Petersen E, Hansen SH. Simultaneous determination of pyrimethamine, sulfadiazine and N-acetyl-sulfadiazine in plasma for monitoring infants in treatment of congenital toxoplasmosis. *J Pharm Biomed Anal.* 2005 Jan 4;36(5):1093-8.
78. Harris C. D. Quantitative Chemical Analysis. New York.2007.
79. Suárez R, Arévalo E, Linares L, Ustáriz F, Hernández G. Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances en Química.* 2009;4(2):53-62.
80. Miller JN, Miller JC. Estadística y Quimiometría para Química Analítica: Pearson Educación; 2002.
81. FDA. Bioanalytical Method Validation for Human Studies. In: Administration FaD, editor. Draft Guidance for Industry. Rockville1998. p. 16.
82. Sokal R, Robert., Rohlf F, James. Introducción a la bioestadística. España.2002. Available from: <http://books.google.com.pe/books?id=t0PXnIO147cC&hl=es>.
83. Trejos N, Tello M. Validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de sulfadiazina de plata en crema. Colombia2008.
84. EURACHEM. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. 1998.



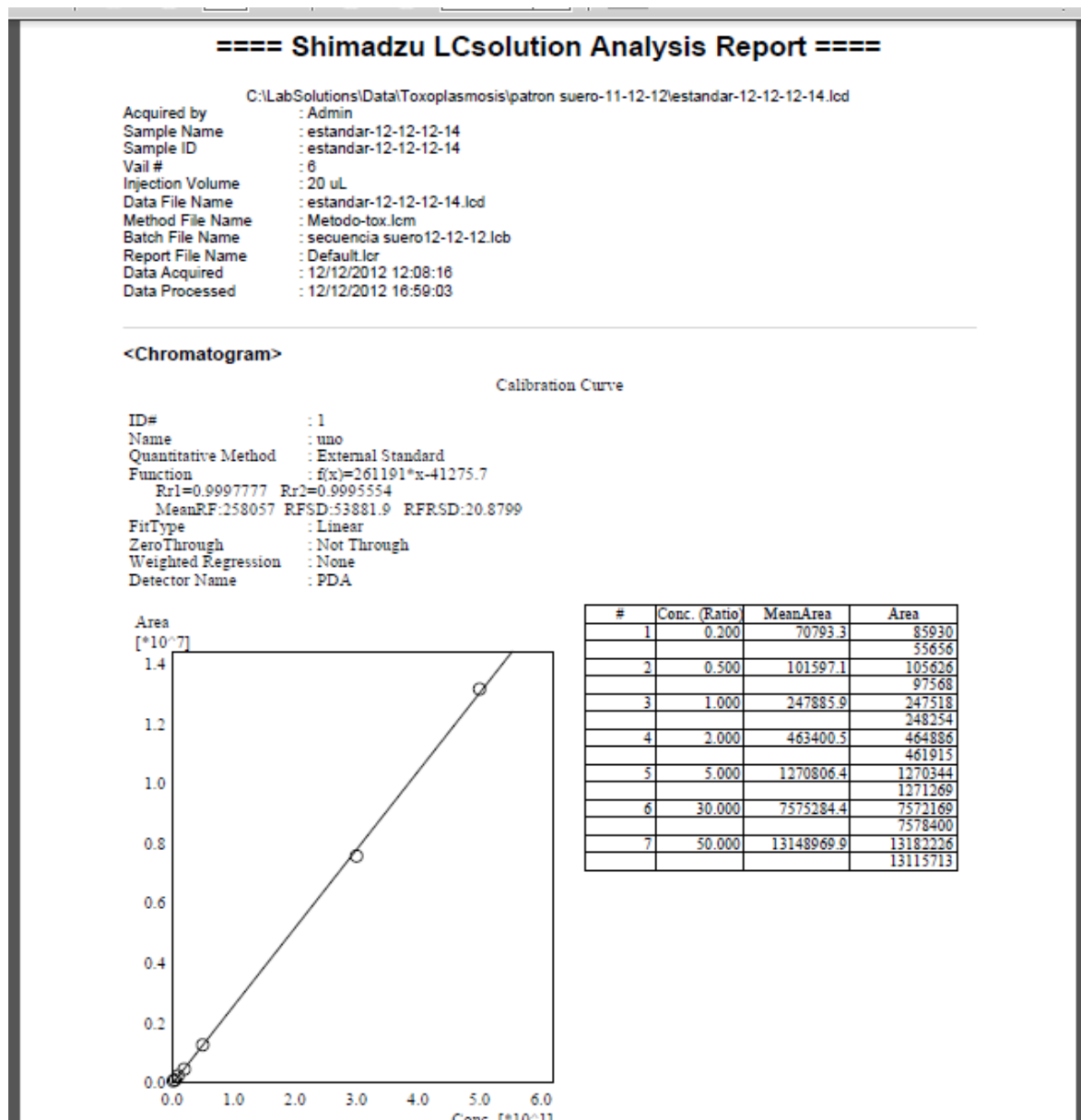
85. Quindío Gd. Plan de Desarrollo "Gobierno Firme por un Quindío más Humano" In: Quindío, editor. Armenia2012. p. 192.
86. FDA. Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. 2003. p. 23.
87. Guía para Muestreo de Alimentos: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)2010.
88. Coulibaly SO, Nezien D, Traore S, Kone B, Magnussen P. Therapeutic efficacy of sulphadoxine-pyrimethamine and chloroquine for the treatment of uncomplicated malaria in pregnancy in Burkina Faso. *Malar J.* 2006;5:49.
89. OMS. El Uso Clínico de la Sangre 2001 [cited 2013 05/12/20013]. Available from: [http://www.who.int/bloodsafety/clinical\\_use/en/Manual\\_S.pdf](http://www.who.int/bloodsafety/clinical_use/en/Manual_S.pdf).
90. Uscategui RM, Correa AM, Carmona-Fonseca J. [Changes in retinol, hemoglobin and ferritin concentrations in Colombian children with malaria]. *Biomedica.* 2009 Jun;29(2):270-81.
91. Wallon M, Cozon G, Ecochard R, Lewin P, Peyron F. Serological rebound in congenital toxoplasmosis: long-term follow-up of 133 children. *Eur J Pediatr.* 2001 Sep;160(9):534-40.
92. Kahi S, Cozon GJ, Pinon JM, Greenland T, Wallon M, Al Kurdi M, et al. A switch towards Th2 during serological rebound in children with congenital toxoplasmosis. *Clin Exp Immunol.* 1999 Sep;117(3):524-8.



## **ANEXOS**

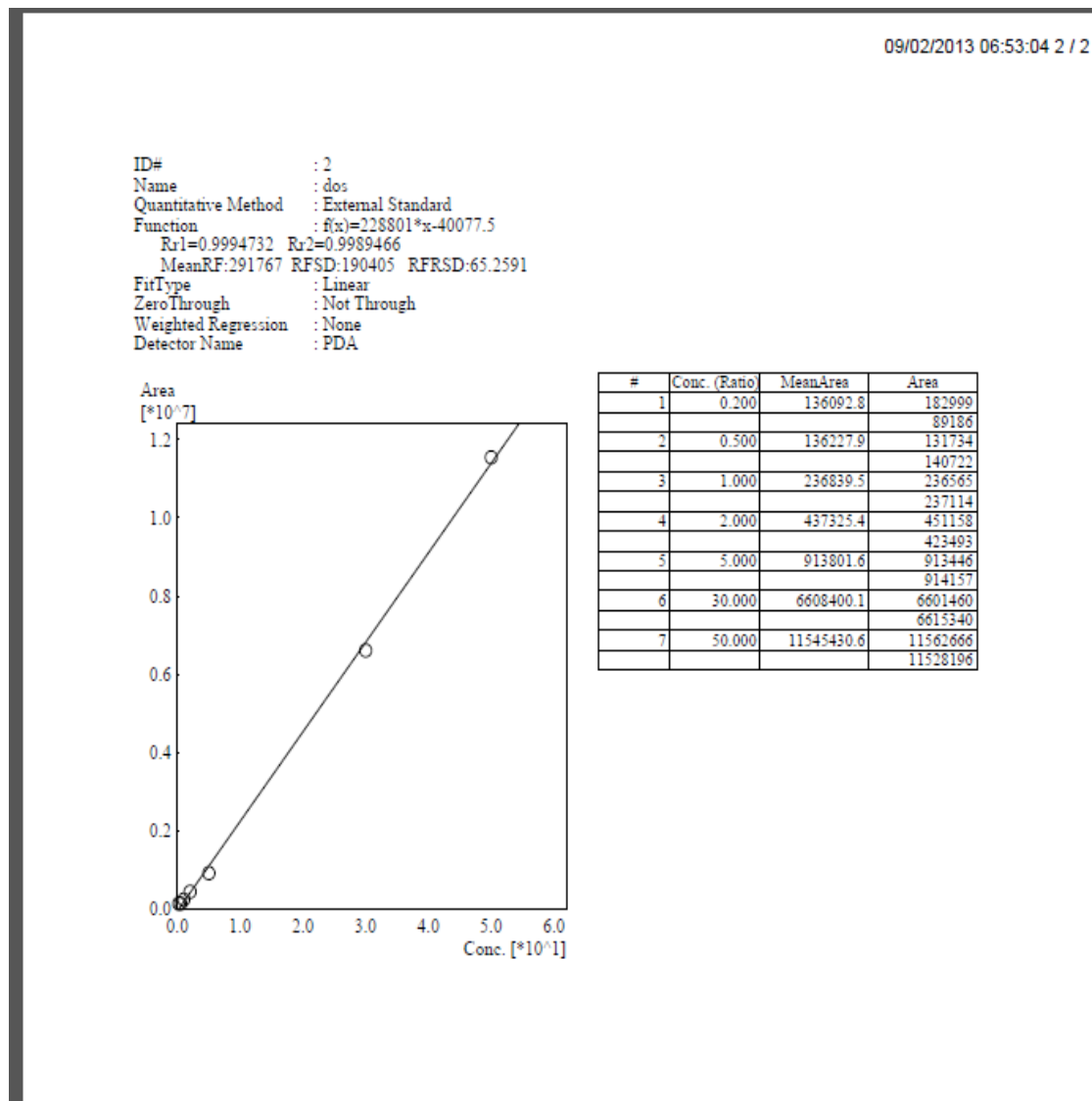


## Anexo 1 Curva de calibración para Sulfadiazina (método).





## Anexo 2 Curva de calibración para Sulfadoxina (método).





Anexo 3 Plantilla de excel - Quimiometría.

PLANTILLA SUMA DE CUADROS INTERNET - Microsoft Excel

Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista

Calibri 14 Fuente Alineación Número Estilos Celdas

Advertencia de seguridad Se ha deshabilitado la actualización automática de los vínculos Opciones...

D94

ENSAYO SDX DE 7 DATOS LINEALIDAD DEL metodo SUMA DE CUADROS MEDIOS ANOYA

	$x-x$	$(x-x) \cdot y-y$	$(y-y)^2$	$(x-x)(y-y)$	$(y-y)$	$(y-y)^2$	$(x-x) \cdot (y-y)$	$(x-x)^2$	$(y-y)^2$	
7	-12,474	155,3365	-2,72E-06	7,42E-12	3338935,85	1082,7	138496,42	6786739185,236	8,84	5,82E-10
8	-12,474	148,1487	-2,72E-06	7,41E-12	33161979,6	74925,8	1138,437	383219915,8245	8,25	5,82E-10
9	-12,474	159,2232	-2,72E-06	7,40E-12	33006223,57	188725,6	48195,38	251518146,4867	9	5,82E-10
10	-12,474	119,8734	-2,72E-06	7,37E-12	2584442,35	49224,2	1088,84	32366278,2516	4	4,31E-10
11	-12,474	118,8382	-2,72E-06	7,36E-12	1492827,45	109282,2	-15812,56	3516818731,8328	25	4,31E-10
12	17,322	388,2794	2,72E-06	1,41E-11	1492827,45	109282,2	-15812,56	4545452179,3628	381	4,32E-10
13	37,322	193,422	8,32E-06	7,55E-12	32424836,5	188888,8	14545,52	2192515164,3488	2381	4,32E-10
14										
15										
16										
17										
18	8,88	2385,3	0,000000	5,21E-10	5,28E-08	8,000000	0,0000000000	9498,23	5,8E-10	5,21E-10
19	8,88000	329,48	8,88	4,79E-10	0,000000					
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29										
30										
31										
32										
33										
34										
35										
36										
37										
38										
39										
40										
41										
42										
43										
44										
45										

CUADRO ANOYA

FUENTE	Grados de Libertad (SC)	Cuadros (CM)	Medios (OM)	Fc	F...it...
REGRESION	1	1,20737E+10	1,21E+10		
RESIDUAL	5	1,27315E+11	2,55E+10	*****	?
Intergrup	1	1,20737E+10	-1,207E+10		
Intra-grup	5	1,20864E+10	2,402E+10	0,3935	
TOTAL	6	1,20864E+10	2,01E+10		

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Tabla de cuantiles de la distribución t de Student



Anexo 4 Distribución de  $t$  para diferentes niveles de confianza.

## 2. Tablas de la $t$ de Student

Pruebas de una cola (unilaterales)	Grados de libertad	0.05	0.025	0.005	0.0005
Pruebas de dos colas (bilaterales)		.10	.05	.01	.001
<b>Grados de libertad:</b> <b>Muestras independientes: <math>N_1 + N_2 - 2</math></b> <b>Muestras relacionadas: <math>N - 1</math></b>	1	6.313752	12.70620	63.65674	636.6192
	2	2.919986	4.30265	9.92484	31.5991
	3	2.353363	3.18245	5.84091	12.9240
	4	2.131847	2.77645	4.60409	8.6103
	5	2.015048	2.57058	4.03214	6.8688
	6	1.943180	2.44691	3.70743	5.9588
	7	1.894579	2.36462	3.49948	5.4079
	8	1.859548	2.30600	3.35539	5.0413
	9	1.833113	2.26216	3.24984	4.7809
	10	1.812461	2.22814	3.16927	4.5869
	11	1.795885	2.20099	3.10581	4.4370
	12	1.782288	2.17881	3.05454	4.3178
	13	1.770933	2.16037	3.01228	4.2208
	14	1.761310	2.14479	2.97684	4.1405
	15	1.753050	2.13145	2.94671	4.0728
	16	1.745884	2.11991	2.92078	4.0150
	17	1.739607	2.10982	2.89823	3.9651
	18	1.734064	2.10092	2.87844	3.9216
	19	1.729133	2.09302	2.86093	3.8834
	20	1.724718	2.08596	2.84534	3.8495
	21	1.720743	2.07961	2.83136	3.8193
	22	1.717144	2.07387	2.81876	3.7921
	23	1.713872	2.06866	2.80734	3.7676
	24	1.710882	2.06390	2.79694	3.7454
	25	1.708141	2.05954	2.78744	3.7251
	26	1.705618	2.05553	2.77871	3.7066
	27	1.703288	2.05183	2.77068	3.6896
	28	1.701131	2.04841	2.76326	3.6739
	29	1.699127	2.04523	2.75639	3.6594
	30	1.697261	2.04227	2.75000	3.6460
	$\infty$	1.644854	1.95996	2.57583	3.2905

Adaptadas de STATSOFT, INC. (2002). *Electronic Statistics Textbook*. Tulsa, OK: StatSoft.

WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>

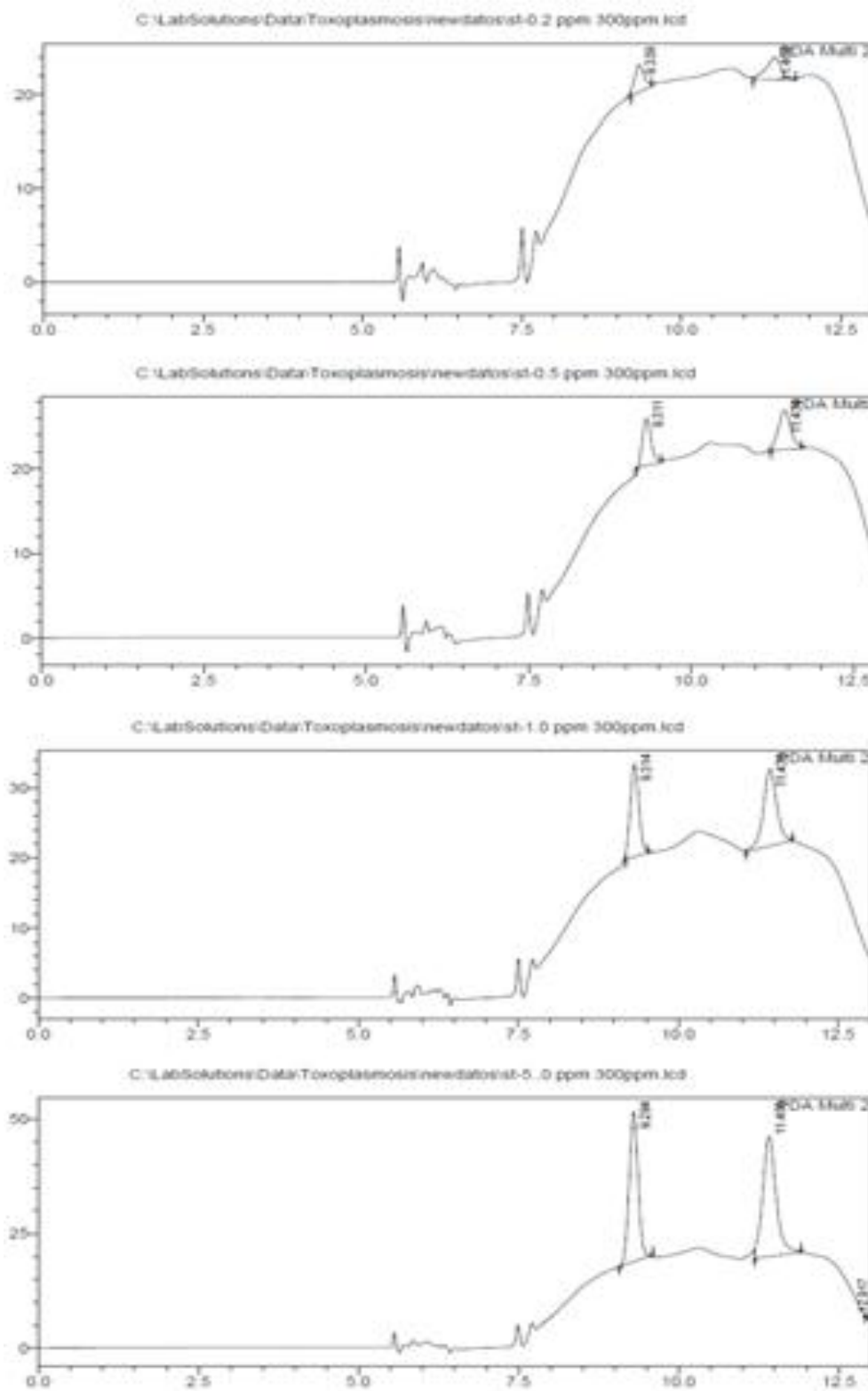




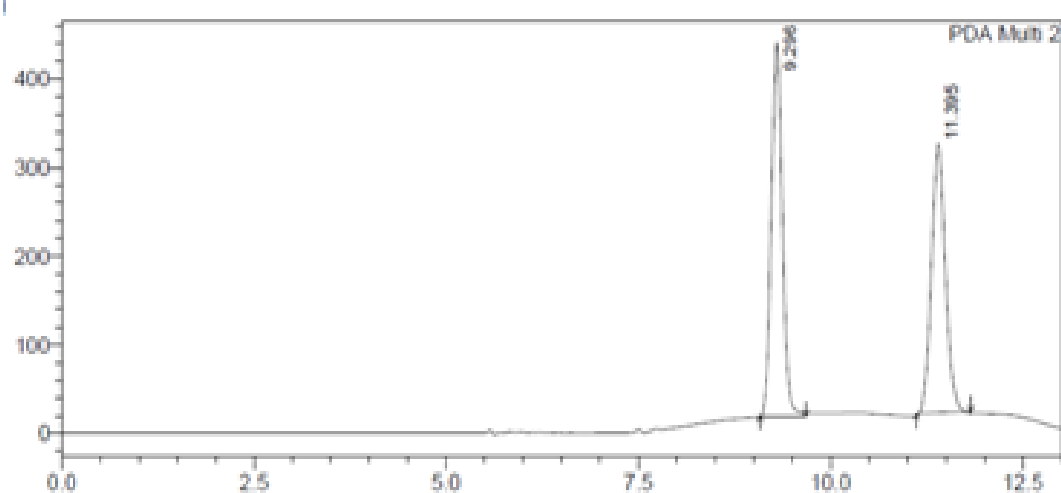
Anexo 5. Tabla de valores de distribución F (0,05)

Grados de libertad del denominador	$F_{0,95} / \alpha = 0,05$										Grados de libertad del denominador
	Grados de libertad del numerador										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,88	240,54	241,88	1
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	2
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	3
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	4
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	5
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	6
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	7
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	8
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	9
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	10
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	11
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	12
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	13
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	14
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	15
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	16
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	17
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	18
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	19
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	20
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	21
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	22
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	23
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	24
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	25
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	26
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	27
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	28
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	29
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	30
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	40
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	60
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,18	2,09	2,02	1,96	1,91	120
500	3,86	3,01	2,62	2,39	2,23	2,12	2,03	1,96	1,90	1,85	500
$\infty$	3,84	3,00	2,61	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	$\infty$

Anexo 6. Cromatogramas curva patrón - 300 ug/mL



C:\LabSolutions\Data\Toxoplasmosis\newdatos\st-30 ppm 300ppm.lcd



C:\LabSolutions\Data\Toxoplasmosis\newdatos\st-50 ppm 300ppm.lcd

