

# Validación de sistema y metodología para la cuantificación espectrofotométrica de Sulfametoxazol. Método no normalizado.

CORAS-FRANCO GYNA A, MARTÍNEZ-COSTALES RICARDO, ROJAS-CAMPOS ABRIL A.  
RUIZ-OLMEDO MA. ISABEL

**Resumen**—El Sulfametoxazol, es un antibiótico bacteriostático que se utiliza comúnmente en combinación sinérgica con Trimetoprima en tabletas y suspensiones.

El presente trabajo describe los resultados obtenidos ante la validación del sistema y el desarrollo del método para la cuantificación de sulfametoxazol en tabletas de un producto comercial (Sulfametoxazol 800 mg y Trimetoprima 160 mg) por espectrofotometría para la prueba de disolución.

La validación del sistema fue realizada en un intervalo de 40 a 120% del equivalente a la cantidad disuelta de la formulación en donde se evaluaron los parámetros de desempeño de linealidad y precisión. Para el desarrollo del método y su aplicación a la prueba de disolución se plantearon dos metodologías de una separación líquido-líquido previo a su determinación espectrofotométrica para el sulfametoxazol. En donde el método de recuperación A mostró tener resultados lineales comparados con el método B.

Generalmente y con base a la determinación y aplicación de metodologías la accesibilidad a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución no se hace frecuente razón por la cual metodologías analíticas aplicables en el aula en donde se pueden utilizar métodos alternos no normalizados para la determinación de analitos y aplicación a medicamentos para realizar la evaluación cuali-cuantitativa.

**Palabras clave**— Sulfametoxazol, Trimetoprima, validación, extracción líquido-líquido, fase organica, fase acuosa, parámetros de desempeño.

## I. INTRODUCCIÓN

Una combinación de fármacos común mente utilizados de amplio espectro es la combinación de Sulfametoxazol y Trimetoprima. Dicha combinación se utiliza para el tratamiento de patologías tales como: infecciones en el tracto respiratorio, oído, tracto urogenital, gastrointestinal, osteomielitis aguda y crónica, nocardiosis, actinomicetoma, toxoplasmosis y blastomicosis Sudamericana ya que se considera como un amplio rango de organismos como brucelosis.[1]

CORAS FRANCO GYNA ALEJANDRA, MARTÍNEZ COSTALES RICARDO, ROJAS CAMPOS AMÉRICA ABRIL, pertenecen a la carrera de QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO de la FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y realizaron el proyecto dentro del curso de DESARROLLO ANALITICO ([gynacoras@live.com](mailto:gynacoras@live.com))

El proyecto fue asesorado por DRA. MA. ISABEL RUIZ OLMEDO

De acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, en México se pueden encontrar en diferentes presentaciones como: tabletas, suspensión oral e inyectable. En su presentación de tabletas se sabe que cada tableta contiene: 160 mg de Trimetoprima y 800 mg de Sulfametoxazol. De acuerdo a la FEUM, se reporta que para tabletas de Trimeoprima y Sulfametoxazol un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para la prueba de disolución. [2]

## FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

El Sulfametoxazol es un fármaco sulfonamida que inhibe la síntesis bacteriana del ácido dihidrofólico compitiendo con el ácido para-aminobenzoico (PABA) por la unión a la dihidropolato sintetasa (dihidrofolato sintetasa). El sulfametoxazol es bacteriostático por naturaleza. La inhibición de la síntesis de ácido dihidrofólico disminuye la síntesis de nucleótidos bacterianos y ADN. La trimetoprima es un análogo de pirimidina que interrumpe la síntesis de folato, una parte esencial de la vía de síntesis de timidina. La inhibición de la enzima priva a las bacterias de los nucleótidos necesarios para la replicación del ADN. [3]

Estos dos fármacos se administran normalmente en combinación. Los estudios han demostrado que la resistencia bacteriana se desarrolla lentamente con la combinación de los dos fármacos que con Trimetoprim o Sulfametoxazol por separado. Afectando principalmente a las bacterias gram negativas y positivas, *Listeria monocitogenes* y *Escherichia coli*. [4][5]

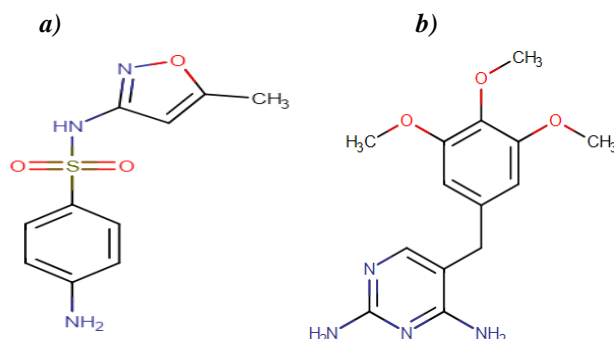


Ilustración 1. Estructuras moleculares de compuestos. a) Sulfametoxazol. b) Trimetoprima

### PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS COMPUESTOS

- Sulfametoxazol[6]:

Estado: sólido

Punto de fisión: 167 °C

Solubilidad: acetona, metanol, ligeramente soluble en etanol, casi insoluble en agua, éter dietílico y cloroformo.

Log P: 0.89

pKa: 6.16 (ácido) y 1.97 (básico)

- Triemtoprima[7]:

Estado: sólido

Punto de fisión: 199 – 203 °C

Solubilidad: alcohol bencílico, ligeramente en cloroformo y metanol, poco soluble en etanol y acetona; muy poco soluble en agua e insoluble en éter dietílico

Log P: 0.91

pKa: 7.12 (20 °C)

### EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

La extracción líquido - líquido, es una técnica muy utilizada debido a que permite eliminar excesos de reactivos o impurezas cuando se tiene una mezcla de compuestos, respecto al proyecto se trabajaban dos compuestos los cuales son: Sulfametoxazol y Trimetoprima.[8] Esta técnica se basa en un reparto del compuesto deseado y de las impurezas entre el medio orgánico y el medio acuoso definiéndose como coeficiente de reparto (K) la solubilidad del compuesto en el medio orgánico dividido por su solubilidad en el medio acuoso.

Se lleva a cabo mediante un procesos de transferencia de una o varias sustancias desde una fase líquida a otra también líquida inmiscible con la primera dando como resultado la separación de una fase orgánica en donde se encuentra la Trimetoprima y de una fase acuosa donde se encuentra el Sulfametoxazol que es el analito de interés a cuantificar.[9]

Un punto importante es la selección del solvente a utilizar donde se deben considerar ciertas características tales como: a) la insolubilidad del disolvente donde debe ser mayor la insolubilidad del solvente y del componente que se no se deseé extraer; b) la recuperabilidad; c) la densidad donde estas densidades deben ser distintas para que sea viable la extracción; d) la tensión superficial, debido a que cuanto mayor sea la tensión superficial entre las fases será fácilmente coalescerán; e) la reactividad y corrosividad, donde los solventes deben ser químicamente estables e inertes respecto al sistema; f) viscosidad, g) temperatura y e) presión.[10]

### VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos analíticos son utilizados para la evaluación de la calidad de los productos farmacéuticos, ya que estos están sujetos a varios requisitos de acuerdo a una normatividad vigente, así como con diversos documentos nacionales o internacionales. Por lo que en México la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) es el documento legal instituido por la Ley General de Salud donde se establecen los

métodos de análisis y los requisitos sobre la identidad, pureza, potencia y otras características de calidad que garanticen que los fármacos, sean eficaces y seguros.[2][11]

Al realizar una propuesta de método analítico se debe considerar si se realizara normalizado de acuerdo a la FEUM o no normalizado.

La validación de un método es un proceso que se establece mediante estudios de laboratorio donde se evalúan parámetros de desempeño que satisfagan los requisitos para su aplicación analítica.

#### Tabla 1. Parámetros de desempeño

##### Parámetros de desempeño

Verificación del sistema
Precisión del sistema
Linealidad del sistema
Especificidad/Selectividad del método
Exactitud del método
Linealidad e intervalo del método
Precisión del método
Límite de cuantificación del método
Límite de detección del método
Robustez del método
Tolerancia del método

Durante el desarrollo del proyecto se llevó la evaluación de los siguientes parámetros:

- Adecuabilidad del sistema: pruebas que verifican que el sistema funcione correctamente, con criterios establecidos, lo cual permite establecer confiabilidad en los resultados obtenidos.
- Precisión del sistema: grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia conocidas.
- Linealidad del sistema: verificación que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajusten a un modelo matemático, en un intervalo de concentraciones preestablecidas.
- Linealidad e intervalo del método.
- Límite de cuantificación del método.
- Límite de detección del método.

## II. EQUIPOS

Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer, purificador de agua Direct-Q3, Ultrasonificador Ultrasonic-Cleaner, filtros estériles con durapore membrana PVDF 0.45µm Merck-Millipore.

## III. REACTIVOS Y SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Metanol, ácido clorhídrico, cloroformo, éter, acetona, hielo seco, estándares primarios de Sulfametoxazol y Trimetoprim USP.

## IV. METODOLOGÍA

### *Linealidad y precisión del sistema*

1) Validación de la linealidad del sistema: se realizó para la cuantificación de Sulfametoxazol en un intervalo de 40 a 120 del % disuelto para la cual se preparó una solución stock de Sulfametoxazol y cinco soluciones estándar en metanol a partir de alícuotas tomadas de la solución stock, dichas soluciones fueron preparadas como se describe a continuación:

- a) La solución stock de Sulfametoxazol se preparó a partir de una sustancia de referencia pesando el equivalente a 11.1 mg, tomando en cuenta su pureza, para posteriormente adicionarse a un matraz de 25 mL y llevar al aforo con metanol.
- b) Para realizar las soluciones estándar a partir del stock se tomaron las concentraciones de la siguiente tabla:

**2) Tabla 2. Preparación de las soluciones para curva estándar.**

<i>Alícuota (<math>\mu\text{L}</math>)</i>	<i>Volumen matraz (mL)</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>	<i>Solvente para aforos</i>
200	10	0.0088	Metanol
300	10	0.0132	Metanol
400	10	0.0176	Metanol
500	10	0.0220	Metanol
600	10	0.0266	Metanol

- a) Una vez preparados los cinco puntos de la curva de calibración se tomó la solución a 0.0220 mg/mL para

realizar la adecuabilidad del sistema (espectrofotómetro UV-VIS) haciendo lecturas de absorbancia por sextuplicado de la solución elegida y calculando el coeficiente de variación entre ellas.

- b) La lectura de la curva estándar se realizó 254 nm y se calculó el coeficiente de variación (% C.V) del factor respuesta, el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) y el error debido a la regresión (%E.R.R) utilizando como blanco MeOH.
- c) La curva de calibración se realizó por triplicado, se realizó el cálculo de la linealidad ( $r^2$  y error relativo debido a la regresión) y precisión (factorrespuesta).

#### **Recuperación del método**

3) Desarrollo del método en tabletas: Se plantearon dos posibles metodologías para la cuantificación en tabletas, para esto en ambas se pesaron y pulverizaron 10 tabletas de Sulfametoxazol/Trimetoprim de un producto de venta comercial y se pesó el equivalente a 44.4 mg de Sulfametoxazol. El desarrollo del método respetó la solución amortiguadora indicada para el MGA (método general de análisis) para la prueba de disolución descrita en la FEUM.

- a) El equivalente se adicionó a un matraz volumétrico de 50 mL y se agregaron 25 mL HCl 0.1 N (37°C) agitando vigorosamente durante 10 minutos.
- b) La solución se sonicó a 37°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó con HCl 0.1 N.
- c) Se filtraron las soluciones a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  de membrana tipo PVDF.

#### • Método A

- o En un embudo de separación de 50 mL se adicionaron 15 mL de la solución muestra previamente filtrada y 15 mL de una mezcla de éter/cloroformo (40:60). El embudo de separación fue sumergido en un baño de acetona con hielo seco, provocando la congelación de la fase acuosa.
- o Posteriormente se decantó la fase orgánica donde se contenía la Trimetoprima y se descongeló la fase acuosa donde se contenía el Sulfametoxazol, separando ambos principios activos.
- o Una vez descongelada la fase acuosa se preparó una curva estándar con las mismas concentraciones reportadas en la tabla 2 como se muestra a continuación:

**• Tabla 3. Preparación de las soluciones para curva estándar**

<i>Alícuota (<math>\mu\text{L}</math>)</i>	<i>Volumen matraz (mL)</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>	<i>Solvente para aforos</i>
250	25	0.0088	Metanol
375	25	0.0132	Metanol
500	25	0.0176	Metanol
625	25	0.0220	Metanol
750	25	0.0266	Metanol

- o Se determinaron las absorbancias y se calculó la eficiencia de la extracción a través de un cálculo de recobro.
- #### • Método B
- o Se preparó una curva de estándar como se muestra en la tabla 3.
  - o Se tomaron 3 mL de cada una de las soluciones estándar de la curva y trasvasaron a tubos de ensaye y se adicionaron tres mL de una mezcla de éter/cloroformo (40:60 %v/v)
  - o Se colocaron los tubos de tubos y se realizó un proceso de congelación a -20°C en un baño de acetona con hielo seco.
  - o Se decantó la fase orgánica donde se contenía la Trimetoprima y se descongeló la fase acuosa donde se contenía el Sulfametoxazol, separando ambos principios activos.

- o Se realizó la lectura de la curva estándar con la fase acuosa y se hizo un cálculo del % eficiencia de la extracción a través de un cálculo de recobro. Se utilizó como blanco HCL 0.1 N.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera etapa de esta investigación consistió en el desarrollo de la metodología para la validación del sistema para la cuantificación de Sulfametoxazol por lo que se estableció que la linealidad del sistema debía ser evaluada el intervalo de 40 a 120 % de la cantidad disuelta de la formulación evaluada.

**Linealidad y precisión**

La ilustración 2 y tabla 4 muestra el gráfico, la ecuación y los valores obtenidos para los valores obtenidos en cuanto a la linealidad y la precisión. Para la determinación de la linealidad se realizó el cálculo del coeficiente de correlación el cual obtuvo un valor superior a 0.99 y un valor para el ERR % que no supero el 2% sin embargo el CV % del factor respues supero el valor del 2% requerido para la aceptación del criter evaluado. Ello sugiere, que el sistema evaluado no posee sensibilidad adecuada para la determinación del analito d interés al aplicar un modelo matemático lineal sin embargo la posibilidad de realizar la bondad de ajuste debe ser evaluada.

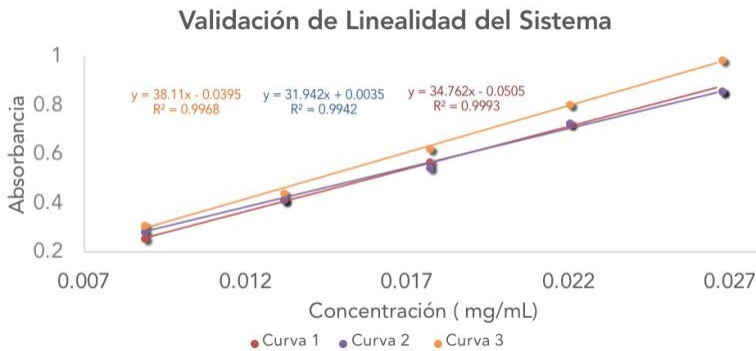


Ilustración 2. Gráfica de Validación del Sistema

Tabla 4. Promedio de factor respuesta en linealidad de Sistema

Curva	Promedio de Factor respuesta
1	0.032
2	0.031
3	0.028

Tabla 5. Parámetros de desempeño y criterios de aceptación para validación del sistema

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Valor obtenido			Dictamen		
r <sup>2</sup>	≥0.99	0.999	0.994	0.997	✓	✓	✓
C.V	≤2 %	6.125 %	3.099 %	3.346 %	✗	✗	✗
E.R.R	≤2 %	0.013 %	0.034 %	0.027 %	✓	✓	✓

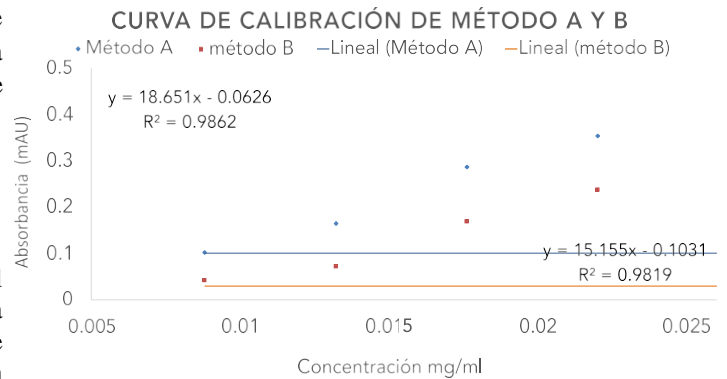


Ilustración 3. Gráfica de curva de calibración del método A y B.

Tabla 6. Promedio de factor respuesta del método

Curva en Método	Promedio de factor respuesta
A	0.070
B	0.134

Tabla 7. Criterios de aceptación y resultados de recobro

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Valor obtenido	Dictamen	Recobro
r <sup>2</sup>	≥0.99	0.086	0.981	✗ ✗ MétodoA
C.V	≤2 %	16.360%	40.165%	✗ ✗ 46%
E.R.R	≤2 %	6.718%	10.166%	✗ ✗ Método B 28.9 %

**Recuperación del método**

Por otro lado se plantearon dos metodologías posibles para la extracción de sulfametoxazol de las tabletas en cuestión. Para ello, se plantaron dos métodos por extracción líquido-líquido en donde se determinó el % de eficiencia de la recuperación. La técnica de separación se basó en el análisis de las propiedades fisicoquímicas y la solubilidad de los compuestos en cuestión en donde con base al pka y la solubilidad de trimetropima y sulfametoxazol se determinó que la separación de los dos compuestos es viable ya que la solubilidad del sulfametoxazol en agua así como las condiciones ácidas favorecen en el procesos de recuperación y separación de la misma.

En la tabla 5 donde se puede observar que los recobros tienen valores por debajo de 50 % lo que indica que la eficiencia de la extracción es baja, esto puede deberse a muchas razones como errores en la manipulación de las extracciones, que los principios activos no tienen la suficiente afinidad con las respectivas fases tanto orgánica como acuosa y se tiene Sulfametoxazol en la fase orgánica, puede ser posible hacer cambios de solventes para mejorar la afinidad de los principios activos a sus respectivas fases en la extracción líquido-líquido. En esta parte del desarrollo del método se trabajó principalmente con la polaridad de las moléculas sin embargo es posible trabajar las extracciones tomando en cuenta las características ácido-base de las moléculas presentando nuevas opciones para mejorar eficiencia de extracción.

Los siguientes pasos se deben enfocar en la optimización del método de extracción para lograr la exactitud requerida para la cuantificación de Sulfametoxazol, una vez logrado lo anterior se deberá completar la validación de los parámetros de linealidad, exactitud y repetibilidad del método, precisión intermedia, especificidad, robustez y tolerancia.

## VI. CONCLUSIONES

La metodología desarrollada en este proyecto fue de tipo no normalizada, siendo posible desarrollar y evaluar el sistema de un método analítico para la cuantificación de Sulfametoxazol así como el desarrollo de una técnica de separación para la evaluación del método utilizando una extracción líquido-líquido. La metodología realizada permitió disminuir el costo y la cantidad de reactivos con respecto a lo reportado por la FEUM (2014) para la cuantificación de Sulfametoxazol y su aplicación de la prueba de disolución, desde el punto de vista de empresas jóvenes que no tienen los recursos para generar métodos cromatográficos pueden tener una opción más viable y finalmente el método desarrollado podría ser empleado también para la cuantificación de trimetoprima.

## VII. REFERENCIAS

- [1] Roche, "BACTRIM," *Medicamentos PLM.*, 2016. [Online]. Available: [http://www.medicamentosplm.com/home/productos/bactrim\\_suspension/154/101/6498/194](http://www.medicamentosplm.com/home/productos/bactrim_suspension/154/101/6498/194). [Accessed: 25-Jun- 2018].
- [2] M. en C. R. del C. A. E.-W. Dra. Mercedes Juan López, Mtro. Mikel Andoni Arriola Peñalosa, *FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS*, 11<sup>o.</sup>, vol. 1. México, 2014.
- [3] N. Mendoza Patiño, *Farmacología médica*, 1<sup>o.</sup>. México: Médica Panamericana, 2008.
- [4] H. E. Callan *et al.*, "Multiple Adduction Reactions of Nitroso Sulfamethoxazole with Cysteiny Residues of Peptides and Proteins: Implications for Hapten Formation," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 22, no. 5, pp. 937–948, May 2009.
- [5] D. C. Bean, D. M. Livermore, I. Papa, and L. M. C. Hall, "Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 56, no. 5, pp. 962–964, Nov. 2005.
- [6] Secretaría de salud and Mexicanos. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos., "Farmacos: Sulfametoxazol," in *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, Volumen I., México, 2014, p. 1327.
- [7] Secretaría de salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos., "Fármacos: Trimetoprima," in *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, Undécima., México: Secretaría de Salud, 2014, pp. 1367–1368.
- [8] Rafael Aguado Bernal, "Extracción líquido-líquido," in *Extracción Líquido-líquido: extracción-decantación*, 2002, pp. 1–5.
- [9] M. Valcárcel Cases and A. Gómez Hens, "Extracción líquido-líquido (II) Técnicas y aplicaciones," in *Técnicas Analíticas de Separación*, 1<sup>o.</sup>, Departamento de Química Analítica, Ed. España : Reverté, S. A., 1988, pp. 209–216.
- [10] A. M. Gomis, *INTRODUCCIÓN A LAS OPERACIONES DE SEPARACIÓN Contacto continuo*, 1<sup>o.</sup>, vol. 1<sup>o.</sup>, no. Edición a cargo de Compobell, S.L. Murcia. España, Alicante, 1999.
- [11] A. P. A. R. R., *Guía de validación de Métodos Analíticos*, Colegio Na. México.