Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Evaluación de rifampicina y sus metabolitos en orina de niños tuberculosos pacientes del Instituto Nacional de Salud del Niño

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Luis Alberto LÓPEZ AVILA

ASESOR

Mg. Luis Alberto ROJAS RIOS

Lima, Perú

1998



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

López L. Evaluación de rifampicina y sus metabolitos en orina de niños tuberculosos pacientes del Instituto Nacional de Salud del Niño [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 1998.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

DEPARTAMENTO ACADEMICO DE FARMACOLOGIA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

CATEDRA DE FARMACOLOGIA



"EVALUACION DE RIFAMPICINA Y SUS METABOLITOS EN ORINA DE NIÑOS TUBERCULOSOS PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO"

Tesis para optar al título de:

QUIMICO FARMACEUTICO

Presentado por:

Br. LUIS ALBERTO LOPEZ AVILA

ASESOR : Q.F. LUIS ROJAS RIOS

LIMA - PERU
1998

Agradezco :

A Dios, por tener tan poco que pedirte
y tanto que agradecerte.

A mis padres Raúl y Juliana, por su amor, dedicación
y apoyo de siempre que hizo realidad el deseo de llegar
a culminar mi carrera profesional.

A mi abuela Rosa, cuyo anhelo era
ver a sus nietos llegar a ser profesionales;
a quien siempre llevaré en mi corazón.

A mi hermana Rosalba por su cariño, paciencia,
comprensión y quien también dentro de poco
será profesional.

A mis familiares y amigos quienes me ayudaron
en todo momento para culminar mi carrera profesional.

Mi especial agradecimiento al Q.F. Luis Rojas Ríos,
quien asesoró la realización de éste trabajo y con quien
espero seguir realizando investigación para gloria de nuestra
Alma Mater y el bienestar de nuestra Patria.



Agradezco a los distinguidos miembros del Jurado:

Presidente: Mg. Américo Castro Luna.

Miembros: Q.F. José Aliaga Arauco
Q.F. Luis Rojas Ríos
Q.F. Armando Rivero Laverde.

A los Directores, Profesionales, Técnicos y amigos del Instituto de Medicina Legal del Ministerio Público, quienes me brindaron su ayuda en éste Trabajo de Investigación, en especial a:
Q.F. Javier Churango Valdez.
Q.F. Sixto Gonzalez Elera.
Q.F. Gladys Muñoz Chacón.
Sta. Lilian Atto Mendivis
Sr. Ernesto Celestino.

Al Q.F. Jesús Lizano Gutierrez (profesor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica) por los consejos impartidos y al Dr. Guillermo Nuñovero (médico del Servicio de Neuropediatría del Instituto Nacional de Salud del Niño) por la ayuda y apoyo que me proporcionaron para realizar éste Trabajo de Investigación.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA
DE FARMACIA
Y BIOQUIMICA

A mis Profesores, Maestros y condiscípulos,
de quienes recibí
y con quienes compartí
lecciones de vida;
muchas gracias.

Por todos ustedes se derrama ésta gota de agua,
en el inmenso Océano de la Ciencia.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

I.- INTRODUCCIÓN

II.- GENERALIDADES

A.- ASPECTOS GENERALES

B.- CUANTIFICACIÓN DE DROGAS

B.1.- Muestras

B.2.- Métodos de Cuantificación

B.3.- Farmacocinética

C.- CARACTERÍSTICAS DE LA RIFAMPICINA

C.1.- Propiedades Biológicas

C.2.- Propiedades Químicas

C.3.- Farmacocinética

C.4.- Farmacodinamia

C.4.1.- Mecanismo de Acción

C.4.2.- Administración y dosis

III.- PARTE EXPERIMENTAL

IV.- RESULTADOS

V.- DISCUSIÓN

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

VI.- CONCLUSIONES

VII.- RECOMENDACIONES

VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

RESUMEN

Para evaluar la Rifampicina y sus metabolitos en orina de 24 horas de niños tuberculosos se necesitó primeramente contar con un método modificado y estandarizado que nos permita realizar la cuantificación de los niveles de Rifampicina en orina para lo cual se llevaron a cabo estudios preliminares que nos ayudaron a realizar esta modificación y estandarización a partir del método de Sunahara y Nakagawa (1)

La determinación de estos niveles se realizó en 12 niños con tuberculosis, de ambos sexos, entre los 2 y 14 años, pacientes del Servicio de Neuropediatría del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN) durante el período de 1997-1998; a quienes se les administró una dosis diaria de Rifampicina de 10 miligramos por kilogramo (mg/Kg) de peso, de la misma especialidad farmacéutica.

La toma de muestras se realizó recolectando la orina durante las 24 horas después de ingerida la Rifampicina. Dichas muestras recibieron un pretratamiento y se determinó cualitativamente por Cromatografía de Capa Fina, comparando la muestra con estándar de la misma droga. Luego se obtuvo la curva estándar y la curva de trabajo de Rifampicina y sus metabolitos espectrofotométricamente. Los resultados numéricos obtenidos en la cuantificación de Rifampicina mediante el método modificado se analizaron mediante pruebas de correlación de Pearson (r), comparando estos valores con los reportes realizados en trabajos anteriores (1, 2) mediante la test de Student. Los resultados obtenidos demuestran que los valores

obtenidos para la curva de trabajo son reproducibles y de que estos pueden considerarse como pertenecientes a una curva estándar. Los valores de las concentraciones se expresan en miligramos de Rifampicina excretados en orina de 24 horas.

Concluimos que nuestro valor promedio, en microgramos de Rifampicina excretada por mililitro de orina; es mayor comparado con el trabajo realizado por George, Bathia y Balakrishnan en 1978 en la India (2), pero menor, en miligramos de Rifampicina excretados en orina de 24 horas; comparado con el trabajo de investigación llevado a cabo por Sunahara y Nakagawa en 1972 en el Japón (1).

Palabras claves: Rifampicina, metabolitos, cuantificación de drogas, monitoreo de drogas, tuberculosis.

SUMMARY

To evaluate the Rifampin and its metabolites in 24-hour urine of tuberculous children, firstly we needed a modified and standardized method from the original one by Sunahara and Nakagawa (1). For this reason we made previous studies which helped us attain this matter and then it was applied in 12 children's samples,with tuberculosis, from both sexs, between 2 and 14 year-old, patients of the Service of Neuropediatric of the National Institute of Child's Health between 1997-1998; who were treated with the same pharmaceutical speciality of Rifampin, with a daily dosis of 10 milligrams per kilogram (mg/Kg) of body weight.

The samples were 24-hour urine recollected after the Rifampin's ingesta. These had to undergo a pretreatment and then the qualitative analysis was made using Thin Layer Chromatography, comparing the extracted samples with Rifampin standard. The accomplishment of standard's and work's curves was spectrophotometrically. The numeric results obtained by the modified method were analyzed by the Pearson's correlation test (r), comparing these with previous publications (2) using the Student's test. The results demonstrated that the values obtained for the work's curve are reproducible and that these can be considered as the work's curve values. The concentration's values are presented in milligrames of Rifampin excreted in 24-hour urine.

We concluded that our mean value, in micrograms of Rifampin excreted per millilitre of urine; is higher than that made by George, Bathia and Balakrishnan in

1978 in Indian (2), but lesser, in milligrames of Rifampin excreted in 24-hour urine; than that realized by Sunahara and Nakagawa in 1972 in Japan (1).

Key words: Rifampin, metabolites, drugs quantitation, drugs monitoring, tuberculosis.



I.- INTRODUCCIÓN

A pesar de que en nuestro país se realizan esfuerzos para combatir la Tuberculosis (TBC), ésta se ha convertido en un mal endémico. El Programa Nacional de Control de la TBC ,implantado en nuestro país; es un claro ejemplo de ello. Pero aunque a través de éste programa; se otorguen los medios que permitan a la población afectada sobreponerse a tan terrible mal, los casos de personas enfermas siguen aumentando al punto que en la actualidad se han observado casos en los cuales el *Mycobacterium tuberculosis* se ha hecho resistente a los fármacos utilizados. Esto se debe en gran parte al mal cumplimiento de la terapia ya que en nuestro medio no existe un modo de evaluar los fármacos en el organismo de los pacientes.

La aparición de cepas resistentes a los fármacos actualmente utilizados (al tener que hacer uso de fármacos más costosos en el tratamiento de dichos casos), el aumento del número de personas infectadas, la inversión económica que sugiere la hospitalización o el tratamiento del paciente por parte del estado, el aumento de dicha inversión en el tratamiento (gratuito para el paciente pero que el estado asume) cuando se prolonga el tiempo de tratamiento al ser un paciente reincidente o que ha incumplido la terapia; todas estas razones influyen en el costo social y económico que implica mayores pérdidas para el país.

En la actualidad la globalización de la economía mundial hace que la población peruana de escasos recursos y en especial los niños sufran las consecuencias de las crisis originadas en diferentes partes del mundo. De esta forma

vemos que un número cada vez mayor de personas se vea expuesta a enfermedades como la TBC.

En el Servicio de Neuropediatría del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN) se observó muchas veces que los niños tuberculosos no respondían al tratamiento, lamentablemente no contaban con una metodología para poder realizar una evaluación de los fármacos utilizados contra la TBC. Además pudimos conocer el interés por parte de ellos en cuantificar a diferentes intervalos de tiempo las concentraciones de Rifampicina alcanzadas en los diferentes fluidos corporales. También se interesaban en cuantificar otros fármacos (como fenitoína y fenobarbital). Existen motivos los cuales exponemos a continuación que nos obligaron a simplificar nuestro estudio pero no por ellos estas futuras investigaciones carecen de importancia.

Gracias a la ayuda de profesores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos pudimos ponernos en contacto con los médicos del Servicio de Neuropediatría del INSN. Pensamos que nuestro estudio es un primer paso en la evaluación de los diferentes fármacos en el organismo, estudios para los cuales el profesional Químico Farmacéutico esta mejor capacitado y posee muchas ventajas sobre otras profesiones y más aún en estos momentos en que el mundo está en crisis. Creemos que nuestra profesión debe ocupar el lugar que merece en el Equipo de Profesionales de la Salud a través de un campo más amplio como es el estudio de la Farmacocinética de Fármacos.

Debido a esa inquietud por parte del personal médico del Servicio de Neuropediatría del INSN nuestro estudio inicial se encaminó en Evaluar la Rifampicina en orina, sangre y Líquido Cefalorraquídeo (LCR) de niños tuberculosos pacientes del Instituto Nacional de Salud del Niño. El primer requisito para nuestra evaluación fue contar con un método estandarizado y adecuado que nos ayude en la cuantificación del fármaco. Numerosos problemas se fueron presentando a medida que iniciábamos la búsqueda. El primero fue que en nuestro país no existen métodos estandarizados para este fármaco, la referencia bibliográfica que pudimos conseguir citando métodos espectrofotométricos para Rifampicina data de 1972 y 1978(1, 2). Al consultar investigaciones más recientes encontramos métodos en los cuales se utilizaba la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) o la Cromatografía Gaseosa con Espectrofotómetro de Masas (GC-MS) para la cuantificación de drogas. Lamentablemente ninguna institución que cuenta con estos equipos a la que nos acercamos solicitando ayuda aceptó financiar nuestro estudio, ya que estandarizar un método con estos equipos demanda mucho tiempo y un considerable financiamiento económico. Fue en ese momento que decidimos basarnos en el método espectrofotométrico para cuantificar estos niveles. Al intentar reproducir el método original se presentaron otros inconvenientes. No disponíamos de los materiales ni los reactivos del método original así que tuvimos que modificar el método utilizando los recursos con que contaba el laboratorio. Para modificar y estandarizar nuestro método a partir del de Sunahara y Nakagawa tuvimos que realizar estudios preliminares que nos ayudaron a alcanzar nuestros objetivos. Para esto utilizamos y

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

ensayamos con éter etílico, cloroformo, cambios de potencial de hidrógeno (pH), eluímos con diferentes mezclas de solventes, realizamos lecturas de espectros de absorción (scanning) a determinados rangos de longitud de onda de la Rifampicina pura, metabolizada, de la orina blanco y de algunos solventes. Al lograr modificar y estandarizar el método y aplicarlo en la cuantificación de Rifampicina en sangre y LCR no obtuvimos los resultados esperados por lo cual sólo pudimos cuantificar el fármaco en orina.

Existen en el Perú numerosos enfermos de Tuberculosis, pero muchas veces es difícil lograr la cooperación de estas personas, además contábamos con la aceptación e interés de parte del Servicio de Neuropediatría del INSN para la realización de nuestro estudio en sus pacientes.

Aparte de lo difícil que resultó la aplicación del método de cuantificación en sangre y LCR, durante el transcurso de la toma de estas muestras observamos en ocasiones que ésta se hacía imposible debido a que los niños tuberculosos llegaban muchas veces con complicaciones (marcados cuadros de desnutrición, epilepsia, meningitis). Al escoger la orina, como material de estudio; pensamos que al ser más fácil de recolectar no íbamos a tener dificultades, pero también éstas se presentaron pues los familiares muchas veces se negaron rotundamente a dar su aprobación para conectar un conducto que sirva para recolectar la orina durante 24 horas (en caso de que el paciente sea varón) o era imposible cuando el paciente era una niña. Debido a estos impases y para no ocasionar mayores inconvenientes tuvimos que seleccionar a nuestros pacientes.

Para finalizar podemos resumir que para evaluar la Rifampicina y sus metabolitos en orina de 24 horas de niños tuberculosos se necesitaba primeramente de un método modificado y estandarizado que nos ayude en la cuantificación de Rifampicina en orina, para esto se realizaron estudios preliminares que nos ayudaron a modificar y estandarizar nuestro método a partir del realizado por Sunahara y Nakagawa (1) para la determinación de estos niveles en 12 niños con tuberculosis, entre los 2 y 14 años, de ambos sexos, pacientes del Servicio de Neuropediatría del Instituto Nacional de Salud del Niño durante el período de 1997-1998, a quienes se les administró una dosis diaria de Rifampicina de 10 miligramos por kilogramo (mg/Kg) de peso, de la misma especialidad farmacéutica.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es:

1 .- Modificación, Estandarización y Determinación de la Curva Estándar del método de Sunahara y Nakagawa utilizado para la extracción, cualificación y cuantificación de Rifampicina y sus metabolitos en orina de 24 horas de niños con tuberculosis.

HIPOTESIS

Para la evaluación de Rifampicina y sus metabolitos en orina de niños tuberculosos se requiere de un método modificado y estandarizado.

PLANTEAMIENTO

1.- Análisis cualitativo de Rifampicina.

2.- Modificación del método espectrofotométrico de Sunahara y Nakagawa para la cuantificación de Rifampicina en orina de pacientes tuberculosos en terapia.

RESULTADOS

Después de obtener los estudios preliminares utilizando la Extracción mediante solventes, la Cromatografía de Capa Fina y los datos espectrofotométricos se logró modificar y estandarizar un método a partir del propuesto por Sunahara y Nakagawa (1) para luego obtener la curva estándar y de trabajo de Rifampicina y sus metabolitos en orina y así evaluar éste fármaco en la orina de niños tuberculosos. Los resultados numéricos obtenidos mediante nuestro método modificado se analizaron mediante pruebas de la Test de student y coeficiente de correlación de Pearson comparando los resultados con los reportados en la literatura (1,2), determinándose que nuestros valores se encuentran entre los rangos que aparecen en la misma. Los resultados demuestran que los valores obtenidos para la curva de trabajo son reproducibles y de que estos pueden considerarse como pertenecientes a una curva estándar. Los valores de las concentraciones se expresan en miligramos de Rifampicina excretados en orina de 24 horas. Concluimos que nuestro valor promedio, en microgramos de Rifampicina excretada por mililitro de orina; es mayor comparado con el trabajo realizado por George, Bathia y Balakrishnan en 1978 en la India (2), pero menor, en miligramos de Rifampicina excretada en orina de 24 horas; comparado con el trabajo de investigación llevado a cabo por Sunahara y Nakagawa en 1972 en el Japón (1).

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

II.-GENERALIDADES

Hacia Abril de 1993 la OMS declaró a la Tuberculosis (TBC) como un problema de Salud Mundial y advirtió que el número de muertes por esta enfermedad alcanzaría los 30 millones en esta década. Para 1996-1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS) calculó que un tercio de la población mundial estaba infectada por *Mycobacterium tuberculosis* y que anualmente se presentaban 8 millones de casos nuevos de TBC activa, de los cuales 3 millones fallecieron a pesar de la disponibilidad de fármacos como la Rifampicina. 95% de los casos y 98% de las muertes estuvo en los países en desarrollo, siendo una de las principales causas de muerte en el adulto. La TBC nunca ha dejado de ser un grave problema de salud en America Latina. Anualmente se notifican alrededor de 230 000 casos de la enfermedad en todas sus formas (3).

La TBC es una enfermedad endémica en el Perú, a pesar de los planes gubernamentales de Salud, ya que el índice de mortalidad es alto dentro de las causas de morbilidad según enfermedades transmisibles. En la década del '70 el número de pacientes de TBC fue de 23843 (en todos los tipos de TBC). Pero durante la década de los '80 aumentó tristemente llegando a los 38723 pacientes en 1988 y 41085 pacientes en 1990 (3). Según información proporcionada por el Ministerio de Salud (MINSA) los casos de morbilidad en los años 1994, 1995, 1996 y 1997 fueron causados por Infección Respiratoria Aguda (IRAs) y Enfermedades Diarréicas Agudas (EDAs), asimismo se incrementaron en este período el Cólera y la Malaria. Otra enfermedad que estuvo adquiriendo mayor incidencia en la población

especialmente pobre fue la TBC. En el Instituto Nacional de Salud del Niño el número de fallecidos debidos a TBC entre los años 1987-1995 fue en promedio 33 niños por año (4).

A.- ASPECTOS GENERALES

La *monitorización de fármacos* en terapéutica o control del tratamiento farmacológico nos permite la evaluación de la eficacia y de la toxicidad de los fármacos en la práctica clínica. Su finalidad es individualizar el tratamiento farmacológico, adaptándolo a las necesidades de cada paciente. Habitualmente se utilizan criterios clínicos, aumentando la dosis hasta que se consigue la eficacia deseada o aparece toxicidad. Este método es el más indicado en todas aquellas situaciones en las que se pueden valorar fácilmente los efectos terapéuticos o tóxicos de los fármacos, como sucede con los analgésicos. En algunas ocasiones la utilización de criterios clínicos no es fácil o posible y , en su lugar, se monitorizan constantes vitales (como la presión arterial en el tratamiento antihipertensor) o parámetros bioquímicos (como la actividad de protrombina en el tratamiento con anticoagulantes orales, o la glucemia en el tratamiento antidiabético). Cuando no es posible emplear estos criterios, los clínicos generalmente consideran que existe resistencia cuando el fármaco es ineficaz y deciden asociar otros fármacos. De la misma manera consideran que existe toxicidad cuando se presenta intolerancia a éste y deciden sustituir el fármaco por otro. Estas consideraciones pueden abandonarse si llevamos a cabo un monitoreo de estas drogas (5).

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

1.- NECESIDAD DE CONTROLAR EL TRATAMIENTO MEDIANTE LA DETERMINACION DE LOS NIVELES SERICOS DE FARMACOS

a) *Fármacos con un índice terapéutico pequeño.* En estos fármacos es frecuente que la dosis "habitual" pueda producir intoxicaciones, especialmente en los pacientes en los que está reducida la eliminación, como sucede con la teofilina en los enfermos con insuficiencia cardíaca y hepática o con los aminoglucósidos en el prematuro. El miedo a provocar efectos tóxicos graves determina que en la práctica se establezca un límite que no suele superarse (por ejemplo, 1000 mg/día de aminofilina, 5 mg/Kg de fenitoína o 3 g/día de procainamida), aunque estas dosis puedan ser insuficientes (hay pacientes que necesitan más de 2000 mg/día de aminofilina, 7mg/Kg de fenitoína o 5 g/día de procainamida). En estos casos, la determinación de los niveles son insuficientes y da seguridad para aumentar la dosis cuando la respuesta no es buena (5).

b) *Dificultad para valorar clínicamente la eficacia.* Un ejemplo de esta dificultad es la utilización profiláctica de los fármacos, como sucede con la teofilina en la prevención de la crisis asmática, los antiarrítmicos en la prevención de arritmias graves, los antiepilépticos en la prevención de las convulsiones febriles o el litio en la profilaxis de la enfermedad maníaco depresiva. Otras veces, la valoración clínica es excesivamente lenta (epilepsia con pocas crisis al año) o compleja (como la valoración de muchos cuadros psicóticos). Por último, hay fármacos que a dosis elevadas pueden empeorar al paciente (como sucede con la nortriptilina en la depresión, la clorpromazina en la psicosis, la procainamida que puede producir

extrasístoles y taquicardia ventricular, la fenitoína o el clonazepam, que provocan crisis epilépticas y la digoxina, que es responsable de arritmias), por lo que resulta difícil saber si debe aumentarse o no la dosis (5).

c) *Dificultad para valorar clínicamente la toxicidad.* Hay signos y síntomas que pueden deberse a la enfermedad o a la toxicidad de los fármacos. Por ejemplo, el nerviosismo y la excitación en un paciente con infarto de miocardio pueden ser psicológicos o deberse a una intoxicación por lidocaína; la hiperexcitabilidad de un asmático puede estar causada por hipoxia o por intoxicación por teofilina; las náuseas y los vómitos pueden deberse a una gastritis o a intoxicación por digoxina o teofilina y los efectos secundarios por antidepresivos pueden ser síntomas de la depresión. Otras veces, los efectos tóxicos pueden pasar inadvertidos; por ejemplo, la "personalidad epiléptica" atribuída a la enfermedad suele ser un efecto tóxico de los antiepilépticos; la encefalopatía por fenitoína se ha atribuido con frecuencia a causas orgánicas y algunos niños con bajo rendimiento escolar mejoran al reducir la dosis de fenobarbital (5).

d) *Necesidad de asegurar la eficacia.* Cuando el éxito o el fracaso de un tratamiento es vital (infecciones graves, arritmias, etc.) no es posible aumentar la dosis de acuerdo con la respuesta clínica. Por ejemplo, en un paciente inmunodeprimido con una infección grave, no se puede administrar una dosis baja de gentamicina para aumentarla si no es suficiente, ni tan poco dar dosis tan altas que aseguren la eficacia a costa de un grave riesgo de toxicidad (5).

e) *Necesidad de prevenir la toxicidad.* En general, no parece razonable tener que llegar a producir efectos tóxicos para saber que se ha alcanzado el umbral terapéutico de un fármaco, pero debe evitarse especialmente cuando la toxicidad puede ser grave (arritmias por procainamida, convulsiones y coma por teofilina) o irreversible (ototoxicidad por aminoglucósidos) (5).

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

CUMPLIMIENTO TERAPÉUTICO

Cumplimiento terapéutico, adhesión a la medicación, fidelidad o docilidad terapéutica *(compliance)* es el grado en el que la administración de la medicación, el seguimiento de una dieta o los hábitos de vida de un paciente coinciden con lo prescrito por su médico. El incumplimiento terapéutico puede deberse a :

a) errores de omisión, cuando el paciente no toma los medicamentos prescritos.

b) errores de propósito, cuando el enfermo ha entendido erróneamente o decide por su cuenta tomar o dejar de tomar un medicamento en una situación inadecuada.

c) errores de dosificación, cuando el paciente toma una dosis distinta de la prescrita.

d) errores de seguimiento de una pauta, cuando el enfermo toma la medicación durante más o menos tiempo del prescrito o no tiene en cuenta las indicaciones de tomarla en ayunas o de evitar la administración simultánea de determinados alimentos.

e) errores de mantenimiento de medicamentos o de automedicación que dan lugar a asociaciones de medicamentos no previstas (5).

La consecuencia del incumplimiento por "defecto" es la falta de respuesta terapéutica. La ineficacia del tratamiento por incumplimiento es una de las

principales causas de fracaso de tratamientos crónicos de eficacia comprobada (tuberculosis, hipertensión, epilepsia) en los que la mayor parte de la recidivas se deben a que el paciente deja de tomar la medicación. También es causa de fracaso de tratamientos agudos (como infecciones agudas tratadas con antibióticos) que no se curan o recidivan porque los pacientes no toman la medicación el tiempo necesario. Esta aparente ineficacia distorsiona el valor terapéutico que el médico otorga al medicamento, lo que le lleva a considerar ineficaces a medicamentos que los pacientes no toman en forma correcta, a tomar decisiones inadecuadas, como asociar otros fármacos, e incluso alterar el diagnóstico inicial de la enfermedad ante la falta de respuesta. Además, daña la relación médico-paciente, ocasiona el almacenamiento de los medicamentos no utilizados y supone un coste sanitario y económico. El incumplimiento por "exceso" suele ser responsable de interacciones e intoxicaciones (5).

En ocasiones el incumplimiento se debe a que el paciente nota efectos indeseables que le inducen a dejar la medicación. Debe diferenciarse entre los efectos secundarios leves, y en general transitorios, que se observan al comienzo del tratamiento, de las reacciones idiosincráticas o tóxicas en las que la supresión de la medicación sería correcta (lo que algunos autores han denominado "incumplimiento inteligente"). Por ello, es conveniente explicar al paciente ambos tipos de efectos y la actitud que debe seguir ante ellos (5).

Aunque el incumplimiento ha existido desde que se administran medicamentos, su relevancia en la respuesta al tratamiento se puso de manifiesto al

demostrarse que casi la totalidad de los fracasos del tratamiento antituberculoso en pacientes no resistentes se debían a que la medicación se tomaba en forma incorrecta. Más recientemente, la determinación rutinaria de los niveles séricos de fármacos ha permitido demostrar que el incumplimiento es un hecho importante y frecuente en fármacos de uso tan habitual como digoxina, teofilina o antiepilépticos, e incluso en tratamientos tan vitales como la ciclosporina para los pacientes trasplantados o los corticoides en niños con leucemia, acercando el problema del incumplimiento a la práctica diaria de la medicina (5).

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CUMPLIMIENTO

El mejor o peor cumplimiento terapéutico se debe a la influencia simultánea de factores relacionados con el paciente, su entorno familiar y la relación con su médico, así como la enfermedad y su tratamiento. La influencia individual de cada factor puede ser variable o no significativa, pero su consideración ayuda a valorar la posibilidad de incumplimiento cuando se evalúa la respuesta al tratamiento de un paciente concreto (5).

a) *Características del paciente.* El factor sociodemográfico más importante es la edad. El incumplimiento del niño pequeño depende en gran parte de los padres, pero; en ocasiones depende del rechazo del medicamento o la dificultad para ingerirlo, que pueden mejorarse con un sabor agradable o una presentación líquida. El adolescente puede tomar incorrectamente la medicación por una actitud de rebeldía ante su enfermedad y ante la obligatoriedad de tomar la medicación. El anciano puede tener problemas de memoria, auditivos y visuales que dificulten la comprensión de las

instrucciones y originen errores. Por el contrario, el sexo, el estado civil, el nivel socioeconómico, el nivel cultural y la actividad profesional no parecen tener una clara influencia, excepto en situaciones tan extremas que no se comprendan las instrucciones o no permitan adquirir la medicación prescrita. Más importantes pueden ser algunos aspectos de la personalidad del paciente, como la hostilidad, que dificultará la relación médico-paciente, o una excesiva autoestima, que le lleve a dudar de que el tratamiento prescrito es el más adecuado, o los pacientes alcohólicos o con personal esquizoide o paranoide que no sigan el tratamiento.

b) *Características del entorno familiar.* Mejora el cumplimiento un entorno familiar en el que el paciente encuentre apoyo moral, interés y ayuda en la toma de la medicación y en el que otros miembros de la familia hayan tenido la misma enfermedad. Por el contrario, empeora el cumplimiento el ambiente familiar negativo.

c) *Relación médico paciente.* Sin duda es uno de los factores con mayor influencia. El médico que atiende a su paciente con una actitud distante y autoritaria o el paciente que no conoce a su médico o duda de su capacidad, perjudican el cumplimiento. Por el contrario, la explicación por parte del médico y la compresión por parte del paciente de su enfermedad y de su tratamiento, lo mejoran. También ayudan a mejorarlo las instrucciones claras y escritas y la supervisión frecuente del tratamiento.

d) *Enfermedad padecida.* Se ha descrito incumplimiento en el 30-70 % de los pacientes con enfermedades agudas y crónicas, graves y leves, sintomáticas o

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

asintomáticas. Las enfermedades que alteran la conciencia, las enfermedades psiquiátricas o que impidan que el paciente se dé cuenta de la gravedad de su enfermedad y las patologías como la tuberculosis, la hipertensión o la epilepsia que cursan con períodos prolongados asintomáticos tienen más probabilidad de incumplimiento. Por el contrario, los factores que más benefician el cumplimiento son el conocimiento y la aceptación de la enfermedad.

e) *Tratamiento.* Junto a la relación médico-paciente, es el factor en el que más se puede influir para mejorar el cumplimiento. Puede empeorar el cumplimiento una duración excesivamente corta (no da tiempo a crear hábito) o excesivamente larga (que puede hacer pensar al paciente asintomático que está curado). También lo empeoran la aparición de efectos indeseables no avisados por el médico y el miedo al desarrollo de tolerancia (es decir, que el paciente crea infundadamente que, si continúa tomando la medicación, dejará de hacerle efecto). Por el contrario, mejoran el cumplimiento el buen conocimiento del tratamiento y lo que se espera de él, las pautas sencillas en cuanto a vía de administración, número de medicamentos y de tomas al día y la mejoría rápida y eficaz de los síntomas al iniciar el tratamiento, que refuerza la confianza (5).

METODOS PARA VALORAR EL CUMPLIMIENTO

Pueden ser directos o indirectos. El método indirecto más utilizado es la información que proporcionan el paciente, sus familiares o el personal de enfermería y la obtenida por la impresión del propio médico. Pero los pacientes tienden a decir lo que creen que el médico desea oír . Por ello, es frecuente que no se reconozca que

ha habido irregularidades en la toma de la medicación. En la impresión del médico influye la respuesta al tratamiento (la ineficacia sugiere incumplimiento por defecto y la toxicidad por exceso). Otro método un poco más objetivo es la estimación de los comprimidos consumidos a partir del recuento de los comprimidos. Hay métodos más específicos que detectan y registran mediante microprocesadores la fecha y la hora en que se abre un envase de comprimidos, jarabe o gotas o se utiliza un aerosol. Unidos a un registro de los efectos terapéuticos o tóxicos, permiten detectar si hay relación entre episodios de ineficacia y olvidos de medicación o entre episodios de toxicidad e ingesta "compensadora" de la dosis olvidada. Aunque estos métodos se utilizan casi exclusivamente en investigación, permiten valorar que la declaración del paciente y la impresión del médico pueden estar notablemente alejadas de la realidad (5).

Los métodos *directos* se basan en la identificación y la cuantificación del fármaco o de un marcador incluido en la medicación. El método directo más utilizado es la determinación de los niveles séricos del fármaco. En los fármacos con vida media larga detectan mejor las omisiones prolongadas que el olvido esporádico de una toma; por el contrario, en los fármacos con vida media corta basta el olvido de una única dosis próxima a la determinación para reducir de manera importante los niveles. Otro problema es que los pacientes con un metabolismo rápido tienen bajos niveles séricos a pesar de tomar bien la medicación, por lo que puede ser necesario determinar simultáneamente los metabolitos para resolver la duda. También pueden

determinarse el fármaco, sus metabolitos o un marcador incluido en el medicamento en orina, pero estas determinaciones no suelen ser cuantitativas (5).

El control del cumplimiento terapéutico mediante métodos directos o indirectos mejora la toma de la medicación porque el paciente sabe que se puede detectar su incumplimiento. Sin embargo, las dudas sobre la toma de la medicación pueden dañar, en algunos casos, la relación médico-paciente (5).

B.- CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS

B.1.- Muestras

ORINA

Normalmente el análisis de drogas en orina puede tener varios objetivos, los cuales incluyen el estudio de balanza de masa, determinación de aclaramiento urinario, estudios de biodisponibilidad, y monitoreo del cumplimiento individual con el régimen de dosaje prescrito. Debido a las marcadas diferencias en las concentraciones urinarias de drogas bajo diferentes condiciones de diuresis, nos interesamos principalmente en la cantidad de droga excretada en un período de tiempo, lo cual requiere la determinación de la concentración de la droga y el volumen total de orina excretada durante este período (6).

Cuando se desea conocer la concentración de una sustancia se utiliza comúnmente muestras de orina recogidas durante tiempos determinados - en nuestro caso 24 horas -. Ciertos constituyentes de la orina requieren estabilización o conservación, lo cual puede lograrse con procedimientos como refrigeración o el agregado de conservantes. La cuidadosa recolección de muestras de orina y su pronto

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

envío al laboratorio son factores esenciales para obtener una óptima información del análisis de orina. La orina debe recogerse en recipientes limpios, secos y estériles, con tapa hermética para impedir su derrame, evaporación y contaminación. Los recipientes deben rotularse con el nombre del paciente, la fecha y la hora de recolección. Hay disponibilidad comercial de sistemas de recolección de orina para ayudar al laboratorio a manejar rápidamente numerosas muestras y estandarizar los resultados. La muestra debe estar libre de secreciones vaginales y otras sustancias extrañas. Es altamente recomendable que la orina sea analizada dentro de las dos horas de haber sido recogida. Si la demora es inevitable, la orina debe mantenerse refrigerada (2 a 8°C). Las muestras de orina recogidas durante períodos determinados se utilizan frecuentemente para cuantificar diversos aspectos de la función renal. La orina debe reflejar la excreción durante un período precisamente medido, es necesario recoger la orina que ha sido producida por los riñones durante un período específico. Estas muestras no deben incluir la orina de la vejiga antes de la prueba cronometrada. Por lo tanto, debe obtenerse una muestra de orina de 24 horas descartando la primera orina de la mañana del primer día y recoger toda la siguiente hasta la primera de la mañana del segundo día inclusive (7).

La orina debe preservarse con Sodio fluoruro o Sodio azida, no debe usarse Mercurio fenil nitrato por las interferencias en inmunoensayos y en algunos métodos por cromatografía de gases. La gran ventaja de usar orina es la elevada concentración de la droga analizada (algunas veces 100 veces), comparada con la hallada en sangre y además está libre de proteínas por lo tanto con poca interferencia. La orina tiene la

desventaja de que algunas drogas son excretadas casi enteramente como metabolitos, ejemplo de esto el delta 9 tetrahidrocannabinol y la mayoría de benzodiacepinas, así que para probar la presencia de una droga en particular se requerirá un análisis de otro fluido o tejido. Además, si la muerte deviene rápidamente, por ejemplo; al inyectar un narcótico analgésico o al inhalar ácido cianhídrico, poco o nada de la droga llega a la orina. A pesar de estas desventajas, la orina aún es la muestra de elección para la detección de dopaje en atletas pues es de fácil obtención en cantidades razonables y generalmente contiene concentraciones detectables de drogas que son dadas en dosis terapéuticas (8).

ALMACENAMIENTO

Una droga que está presente en una muestra biológica se descompone durante el almacenamiento y no se detectará cuando la muestra se lleve a análisis. En situaciones clínicas la droga tomada se conoce y si al ser analizada no se encuentra se supone que no ha sido tomada o que se ha descompuesto. Sin embargo, la situación es menos evidente en casos donde la identidad de la droga no es conocida o si no está confirmada primeramente la presencia de ésta. Ejemplos de drogas que se descomponen durante el almacenamiento de muestras de sangre o hígado a 4 °C son Clonazepam, Cocaína, Isoniazida, Lisergida, Metadona, Metilfenidato, Morfina, Nitrazepam, Paracetamol, Procaína y Triazolam. Se encontró menor concentración de cianuro en una muestra luego de almacenamiento a -16 °C. En todos estos casos se sabía que la droga había sido ingerida o fue medida en muestras frescas. A concentraciones terapéuticas sanguíneas Nitrazepam parece descomponerse a una

tasa de aproximadamente 6% por día a temperatura ambiente. Otras benzodiacepinas no parecen ser tan inestables. El Nitrazepam y el Clonazepam parecen ser más inestables en sangre que en solución acuosa, lo que indica que la descomposición es enzimática y no química. La descomposición debe evitarse añadiendo sodio fluoruro al 1%. La inestabilidad de la Isoniazida en sangre no sorprende debido a su similitud estructural al compuesto endógeno nicotinamida (8).

FACTORES QUE ACTÚAN DURANTE EL ALMACENAMIENTO

i) Luz.- Las drogas como los alcaloides del ergot y los fenotiazínicos son fotosensibles. Cuando están presentes en un sólido como una muestra de hígado o en un medio opaco como sangre, el grado de descomposición se reduce. Sin embargo, la muestra debe almacenarse protegida de la luz y el análisis debe realizarse lejos de la luz directa del sol. Las muestras de orina y de estándar en medio acuoso deben tratarse con especial cuidado y los envases deben estar cubiertos preferentemente con hojas de aluminio durante el análisis. Para drogas que son extremadamente fotosensibles (Lisergida) los análisis se realizan mejor en ambientes oscuros (8).

ii) Oxidación .- Cuando se sospecha que las drogas son fácilmente oxidables, por ejemplo catecolaminas como adrenalina; todos los envases deben estar llenos y convenientemente sellados para eliminar el oxígeno atmosférico. Además pueden utilizarse antioxidantes como el ácido ascórbico o el sodio metabisulfito para eliminar el oxígeno de la muestra. Sin embargo, estos agentes reductores pueden reducir los metabolitos N-óxidos hasta aminas progenitoras en la orina, por ejemplo las fenotiazinas, tioxantenos, antidepresivos tricíclicos y algunos antihistamínicos.

Las drogas de origen fenólico (Paracetamol y Morfina) son fácilmente oxidables a 4 °C. Las drogas que contienen grupo sulfuro pueden ser oxidadas in vitro en solución alcalina. Así, la Tiopentona puede ser convertida a pentobarbitona mientras es extraída nuevamente de un solvente orgánico hacia un medio acuoso alcalino. Además, la Tiopentona puede ser oxidada al mantenerse a temperatura ambiente en solución acuosa u orgánica (8).

La concentración de ciertos iones es importante en los procesos oxidativos, ya que los iones metálicos pueden actuar como catalizadores. Los efectos de los iones en la orina pueden ser reducidos al añadir una proteína como suero bovino o albúmina. Las soluciones de algunas drogas lábiles son más estables en plasma que a la misma concentración en agua (8).

iii) Hidrólisis.- La identificación de cocaína en sangre es un proceso rutinario si el monitoreo se realiza a pocas horas de la ingesta, pero hay problemas cuando no se conoce lo analizado. La actividad de la esterasa en sangre es elevada e hidroliza la cocaína via el grupo éster (8).

iv) Temperatura.- Se asume que el congelamiento de las muestras biológicas es el método ideal para conservar las drogas. Esto debe ser cierto para muchos compuestos, pero existen excepciones, particularmente compuestos fácilmente oxidables, como fenotiazinas (8).

En general es mejor almacenar muestras que se analizarán en pocos días a 4° C. Aquellas muestras que tomarán más tiempo para el análisis deben almacenarse a -20°C y solamente se descongelarán una vez para el análisis. Para un

almacenamiento de mucho mayor tiempo, debe considerarse el secado-congelamiento, especialmente para muestras que son usadas para soluciones estándar (8).

B.2.- MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

Hay que tener presente que para cada droga se necesita una técnica de cuantificación, además debemos tener presente que se requiere:

(i) Equipo especializado

(ii) Personal capacitado

(iii) Reactivos costosos

(iv) Técnicas de trabajo estandarizadas

(v) Versatilidad

(vi) Especificidad, precisión, rapidez y sensibilidad.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Debemos tener en cuenta que el procedimiento de trabajo puede realizarse continuamente o requerir de etapas. Los estudios farmacológicos requieren ensayos de sensibilidad, pero la rápidez y la especificidad son menos importantes. Se subestima rápidamente la necesidad de especificidad. No sólo pueden estar presentes agentes antimicrobianos no reportados, sino también metabolitos activos e inactivos. Por ejemplo los metabolitos de sulfonamidas y Cloranfenicol son inactivos, los metabolitos de Cefotaxima, Cefalotina, Cefapirina y Rifampicina tienen solamente una porción de la actividad de las drogas progenitoras. La agudeza es menos importante en ensayos clínicos que en estudios farmacológicos. La velocidad del análisis está enfatizada para los ensayos clínicos. Lo que en realidad se necesita en la

mayoría de los casos es un resultado dentro del límite de tiempo de un intervalo de dosis (6).

PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

PRUEBAS MICROBIANAS

El término antibiótico, según se usa en los compendios oficiales, designa una preparación medicinal que contiene una cantidad significativa de una sustancia química producida por un microorganismo o artificialmente por síntesis y que posee la capacidad de inhibir o destruir microorganismos en solución diluída. Bajo los términos del Acta Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos de 1938, modificada por Ley Pública 87-781, todos los antibióticos que van a usarse en el hombre se hallan sujetos a controles de producción y prueba bajo supervisión federal, incluyendo la supervisión en lotes antes de la distribución (9).

En la evaluación de la potencia de sustancias antibióticos el efecto medido es la inhibición del "crecimiento" de una cepa adecuada de microorganismos, o sea, la prevención de la multiplicación del microorganismo de prueba. Los procedimientos empleados en el ensayo microbiano de los antibióticos pueden dividirse en dos clasificaciones: el *método de la placa-cilindro* y el *método turbidimétrico (9).*

a)*método de la placa-cilindro.* La prueba de la placa cilindro (copa) para medir la potencia antibiótica se basa en la modificación del diámetro de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano que rodea a cilindros (copas) que contienen varias diluciones del compuesto a ensayar, las cuales se colocan sobre la superficie de un medio nutritivo sólido inoculado previamente con un cultivo de un microorganismo

adecuado. La inhibición producida por el compuesto de ensayo se compara con la producida por concentraciones conocidas de un estándar de referencia.

b)*método turbidimétrico.* El ensayo turbidimétrico de potencia antibiótica se basa en la inhibición del crecimiento microbiano según lo indica la medición de la turbidez (transmitancia) de suspensiones de un microorganismo adecuado en un medio líquido al cual se le ha agregado cantidades graduadas del compuesto a ensayar. Los cambios de transmitancia producidos por el compuesto de prueba se comparan con los producidos por concentraciones conocidas del material de referencia (9)

El valor del ensayo microbiológico está disminuido si se forman metabolitos activos (o tóxicos) o si se administran varios antibióticos. Lamentablemente el organismo de ensayo imita la sensitividad de la droga del organismo infectivo y los resultados del ensayo no representan la actividad antibiótica del suero ante el organismo (6).

ENSAYOS QUÍMICO

Los métodos químicos clásicos aún son utilizados para monitoreo terapéutico. Los problemas terapéuticos son la falta de especificidad y versatilidad de los procesos individuales. Por ejemplo, el procedimiento Bratton-Marshall para sulfonamidas no es específico. Similarmente, el procedimiento colorimétrico para Cloranfenicol que implica una reducción del grupo nitro seguido de la reacción de Bratton-Marshall, responde a varios metabolitos así como a Cloranfenicol succinato. Sin embargo, los métodos químicos relativamente específicos están disponibles para los agentes antimicrobianos selectivos, por ejemplo algunas de las penicilinas y

cefalosporinas; éstos métodos posiblemente no son prácticos para la mayoría de laboratorios clínicos, porque estas drogas se miden pocas veces (10).

*ESPECTROFOTOMETRÍA

Uno de los principales usos de la espectrofotometría ultravioleta y visible es la cuantificación . Una concentración desconocida si sigue la ley de Beer puede ser determinada siguiendo la ecuación :

$$log\,(Io/I) = E.c.L$$

donde Io es la intensidad de energía incidente, I es la intensidad de energía emergente, c la concentración, L es el espesor en cm del absorbente y E la absortividad molar. La curva de calibración grafica la absorbancia versus la concentración (11).

Generalmente los espectrofotómetros para el ultravioleta y visible tienen como limite inferior el rango que va de los 165 a los 210 nm. El limite superior nunca es menor de 650 nm, pudiendo extenderse hasta los 1000 nm o más (12).

La absorción selectiva entre las moléculas orgánicas está relacionada con la localización de los electrones en la molécula. Los compuestos completamente saturados no muestran una absorción selectiva en las regiones del visible y en las accesibles del ultravioleta lejano. Las dobles ligaduras conjugadas producen absorción a mayores longitudes de onda. Entre más extenso sea el sistema conjugado, mayores serán las longitudes de onda a las que se observe la absorción. Si el sistema se extiende demasiado, la absorción penetrará en la región del visible y presentará color (12).

La espectrofotometría ultravioleta y visible encuentran su aplicación primaria en el análisis cuantitativo. La amplitud de la espectroscopia de absorción puede extenderse significativamente por el uso de reacciones de coloración, lo que frecuentemente incrementa la selectividad y la sensitividad. Tales reacciones se utilizan para modificar el espectro de una molécula absorbente de tal manera que ésta pueda ser detectada en la región visible, bien separada de otros componentes que interfieren en el espectro ultravioleta (13).

La amplitud de la espectrofotometría ultravioleta y visible puede extenderse mucho más cuando se combina con un método de separación cromatográfica como HPLC. El desarrollo de detectores de escaneo rápido basados en el arreglo de fotodiodos permite obtener espectros durante la elución de picos. Con la ayuda de computadoras la manipulación de estos espectros ha redefinido nuevas estrategias de análisis de picos cromatográficos, basados en técnicas clásicas de espectroscopia (13).

ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Las interacciones de las drogas con enzimas específicas es la base de los ensayos enzimáticos de drogas en muestras biológicas. Los procedimientos de los ensayos, enzimas, y los modos de detección son variados, pero generalmente implica la cuantificación de los niveles reactivos por Ultravioleta (UV) y espectroscopia visible o análisis radiactivo. Por ejemplo, el metotrexato inhibe la enzima dihidrofolato reductasa, la cual puede determinarse midiendo la tasa de desaparición de la máxima absorción UV a 340 nm del hidrógeno fosfato de nicotinamida adenina

dinucleótido (NADPH). Este ensayo enzimático es similar en su selectividad al ensayo competitivo de unión a proteína con reducción del dihidrofolato; sin embargo, el ensayo enzimático es más trabajoso y menos sensitivo que el ensayo competitivo de unión a proteína. El ensayo de digoxina que emplea sodio potasio adenosina trifosfatasa (Na-K-ATP-asa) puede desarrollarse como un ensayo de unión a proteína o como un ensayo enzimático. Los glucósidos cardiácos suprimen la absorción de Rubidio 86 (^{86}Rb) hacia los globulos rojos al inhibir la Na-K-ATPasa. La extensión de la inhibición enzimática refleja la actividad intrínseca del glucósido cardíaco (6).

Varios ensayos emplean enzimas bacterianas (factores R) que inactivan antibióticos específicos y así contribuyen a la resistencia bacteriana ante estos antibióticos (cloranfenicol, gentamicina). El punto final del ensayo es la inactivación completa del antibiótico por acetilación o adenilación; los productos pueden ser aislados y su reactividad determinada, si se utilizan cofactores radiactivos. Alternativamente, el grupo sulhidrilo de la CoenzimaA puede ser ensayado colorimétricamente en el ensayo de gentamicina, ya que el consumo de cosustrato es estequiométrico. Tal análisis requiere una enzima altamente específica. El ensayo de amfetamina está basado en la completa formación de N-metilamfetamina hasta el punto final; sin embargo la enzima es no-específica y se requiere de purificación del producto radiactivo (6).

Los ensayo enzimáticos son medianamente útiles para análisis de drogas en fluidos biológicos. La falta de fuentes enzimáticas de elevada calidad limita la utilidad de estos ensayos (6).

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

INMUNOENSAYOS

La elevada afinidad para la unión de una droga a proteínas es la base de los ensayos de unión competitiva. La naturaleza de la proteína puede servir como criterio para la clasificación de estos ensayos en inmunoensayos, los cuales utilizan anticuerpos específicos de drogas y se encuentran entre el mayor porcentaje de ensayos de unión a proteína y en ensayos utilizando otras proteínas, por ejemplo; enzimas marcadoras de drogas, receptores y proteínas transportadoras. Los inmunoensayos están más ampliamente subdivididos de acuerdo al método analítico por la cual la fracción de droga libre y unida a proteína es medida: radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático u otro inmunoensayo de menor importancia en el análisis de drogas (inmunoensayo por espín, fluorescencia o nefelometría) (6).

Asumiendo como una simple reacción biomolecular entre el ligando (S) y la proteína (P), puede derivarse la siguiente expresión a partir de la ley de acción de masas:

$$B/F = K(P° - B)$$

donde K es la constante de equilibrio en la dirección de formación del complejo S-P, $P°$ es la concentración molar de los sitios de unión a proteínas, y B y F son las concentraciones del ligando S unido y libre. Se observa que B/F disminuye con el

incremento de *B*, y la unión del ligando S marcado a la proteína disminuye con el incremento de la concentración del ligando no marcado. El procedimiento analítico que implica la detección cuantitativa de la fracción libre y/o unida del ligando S marcado y la construcción de una curva estándar con concentraciones conocidas de la droga. Existen numerosas variaciones del trazador, incubación y detección en los ensayos de unión competitiva a proteínas. Sin embargo, unos pocos principios pueden aplicarse a la evaluación de tales ensayos (6).

1. El mayor determinante de la sensibilidad y especificidad del ensayo es la naturaleza de la interacción de la unión de ligando-proteína. La afinidad, o constante de disociación, limita la sensibilidad del ensayo. Usualmente, la constante de afinidad debe ser mayor de 10^9 M^{-1} para ensayos de drogas altamente sensibles en suero que contienen muchas proteínas de unión a drogas con baja afinidad. La extracción y separación de la droga de uniones a proteínas no-específicas en suero es necesaria para alcanzar la máxima sensibilidad del ensayo. Más aún, la afinidad cruzada de la proteína de unión a otros compuestos en las muestras determina la especificidad del ensayo para una droga. Muchas de las proteínas seleccionadas para ensayos de unión competitiva son altamente específicas; aunque los metabolitos de la droga y sustancias endógenas análogas son químicamente muy similares a la droga de interés y pueden interferir con el proceso de unión droga-proteína. De allí que es primordial realizar ensayos para conocer las interferencias que pueden ocasionar estos análogos de drogas que pueden estar presentes en la solución de ensayo. Frecuentemente, los metabolitos inactivos de drogas están presentes en mayores

concentraciones que la droga original activa y una afinidad cruzada de la proteína a un metabolito de la droga de sólo 1% puede causar una interferencia significativa en el ensayo.

2. La habilidad para detectar los ligandos marcados unidos a proteínas y libres limita la sensibilidad del ensayo. Frecuentemente, el ligando marcado está presente en pequeñísimas concentraciones relativas al ligando de droga no marcados, requiriendose una alta sensibilidad para la detección. Por ejemplo, un trazador marcado con Carbono 14 (un átomo de Carbono 14 desplaza a un átomo de Carbono 12) tiene una radioactividad de ~50 mCi/m mol, mientras que un trazador enriquecido con Hidrógeno 3 tiene una actividad específica de ~20 Ci/m mol y puede ser detectado a una concentración 100 veces menor.

3. El ligando marcado o el modo de detección puede contribuir a interferir en el ensayo si el ligando marcado y la droga poseen diferentes características de unión o el modo de detección está sujeto a error por factores no relacionados a la reacción de unión (reacciones enzimáticas).

4. El modo de incubación de la reacción de unión (análisis del equilibrio o métodos de no-equilibrio), los métodos de detectar y/o separar ligandos marcados libres y unidos, y la preparación de la muestra biológica participan en los resultados del ensayo; sin embargo, no son tan significativos como la naturaleza de la proteína de unión y el marcado.

5. Algunos ensayos de unión requieren la separación física del ligando marcado unido y libre antes del análisis, ya que el método analítico no diferencia entre el

marcador libre y unido (trazadores radioactivos). Estos ensayos son conocidos como heterogéneos. En cambio, los ensayos de unión a proteína homogéneos emplean marcadores que pueden ser diferenciados de sus formas libre y unida a proteína y no requieren separación.

6. Los datos obtenidos de un ensayo de unión competitiva no brindan conocimiento acerca de las potenciales interferencias, las cuales pueden detectarse con técnicas cromatográficas observando la localización y forma de los picos. Si los ensayos de unión competitiva son empleados en laboratorios clínicos para monitoreo terapéutico de drogas es necesario saber que los ensayos de interferencias en numerosas muestras de pacientes tomadas al azar son insignificantes. Llegar a ensayos de referencia confiables de especificidad comprobada es lo que se necesita (6).

Los ensayos inmunorradiométricos (IRMA) utilizan un gran exceso de fijador (anticuerpo) de modo que prácticamente toda la variable analítica queda ligada aunque la constante de fijación no sea grande. En un tipo de IRMA se usa un anticuerpo Q^* marcado radioactivamente. Agregando a la variable analítica un gran exceso, P queda completamente ligado:

$$P + Q \longrightarrow P\,Q^* \ (+\ Q^*\ exceso)$$

El exceso de anticuerpo marcado se remueve usando un ligando que se ha inmovilizado por fijación a una fase sólida *P-sp:*

$$Q^*\ exceso + P\text{-}sp \longrightarrow Q^*\,P\text{-}sp$$

La radioactividad que queda en solución representa el anticuerpo radiactivo ligado PQ^* y es por lo tanto una medida de la concentración de variable analítica en la muestra (14).

En general los ensayos enzimáticos tienen la ventaja de ser rápidos, simples, fáciles de automatizar y versátiles lo que los hace aconsejables para las aplicaciones clínicas de rutina y en el screening de drogas (14).



ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Se han desarrollado técnicas cromatográficas para casi todos los agentes antimicrobianos y éstos ofrecen una versatilidad que falta en los ensayos inmunológicos o enzimáticos. Los ensayos cromatográficos pueden ser más específicos y más económicos cuando se aplican a pocas muestras. Los sistemas más utilizados tienen inyectores automáticos. La preparación de las muestras se realiza manualmente y no se tienen procedimientos estandarizados ni kits. Tiene el inconveniente junto con los bioensayos y ensayos enzimáticos de que existe una amplia variedad de métodos. La precisión y la agudeza de los ensayos cromatográficos son un poco menores que los inmunoensayos. Esto se debe más a la falta de estandarización que a una propiedad inherente del cromatograma (10).

Se denomina cromatografía a un procedimiento, en el cual una solución de sustancias a separar se desplaza en una dirección predeterminada por una disposición de aparatos, por medio de una materia sólida, insoluble, inorgánica u orgánica más o menos firmemente repartida, siendo retenidos los componentes en medida

individualmente distinta. Como mecanismos fundamentales han de tenerse en cuenta el reparto entre dos fases líquidas, así como la unión reversible de las combinaciones que se desplazan a la superficie del absorbente. Si en el último caso se trata principalmente de interacciones superficiales físicas, se habla de cromatografía de adsorción o cromatografía de Tswett, así denominada en memoria de su descubridor. En el caso de la cromatografía por intercambio iónico, se llega a la formación reversible de auténticas combinaciones heteropolares químicas entre la combinación y el adsorbente. En este caso, éstos se presentan como iones con carga distinta. En la práctica, la mayoría de las veces se trata de una combinación de cromatografía de adsorción, de intercambio iónico y de reparto, dominando más o menos uno u otro tipo (15).

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

La Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) se ha establecido rápidamente como uno de los métodos más adaptables para medir numerosas drogas. Sin embargo le falta sensibilidad. Estos métodos generalmente son precisos y más específicos que otras técnicas analíticas. Esta última consideración es especialmente importante en el análisis de drogas que sufren un largo metabolismo y cuyos productos se encontrarán en circulación más tiempo que el compuesto original. El método es más rápido de utilizar que las técnicas cromatográficas y tiene un amplio rango de aplicabilidad (16).

El término cromatografía líquida se usa hoy para referirse a aquellos métodos en los cuales la separación tiene lugar dentro de una columna empacada. El material

de empaque es la fase estacionaria y puede ser un sólido con capacidades adsortivas o un soporte inerte revestido de una fase líquida. Se usa una fase líquida móvil como eluyente (16).

El proceso de la cromatografía líquida puede ser realizado utilizando uno de los métodos. En el primero, el procedimiento clásico desarrollado por Tswett, denominado *cromatografía de columna abierta*, se deja fluir a la fase móvil a través de la columna empacada bajo la influencia de la gravedad, o a lo sumo una baja presión, por ejemplo, 50-100 psi. En el segundo, la fase móvil es forzada a través de la columna empacada merced a alta presión. Aquí el diámetro de partícula es típicamente de 10 um o menos, y como resultado de ello las columnas se empacan más compactamente y desarrollan altas retropresiones que necesitan del bombeo de la fase móvil a través de la columna (17).

CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

Es la técnica de elección para analizar drogas en sangre y otros fluidos biológicos a pesar que posee las desventajas de ser relativamente lenta, muy trabajosa y poco sensible para muchas drogas (16).

En 1941, en su trabajo sobre cromatografía de partición que delineaba la teoría de los platos, Martin y Synge propusieron la técnica de cromatografía gaseosa con la siguiente observación:

"La fase móvil no precisa ser líquida, sino que puede ser un vapor ...Las separaciones muy refinadas de las sustancias volátiles, por lo tanto, serían posibles en una columna en la cual un gas permanente fluyese sobre un gel impregnado con

un solvente no volátil, en el cual las sustancias a separar obedeciesen aproximadamente la ley de Raoult." (17).

En los diez años siguientes nadie siguió esta sugerencia, de modo que Martin la reelaboró y junto con A.T. James desarrolló las primeras separaciones usando la cromatografía gaseosa. Una vez que la validez y la utilidad del método fueron demostradas , otros investigadores adoptaron pronto la idea, y la cromatografía gaseosa fue aplicada a la investigación científica con más rapidez y amplitud que cualquier otra técnica analítica desarrollada antes. Varios trabajos han sido publicados usándola como técnica analítica y muchos instrumentos se hallan en uso en los laboratorios de todo el mundo (17).

La metodología de la cromatografía gaseosa se divide en dos clases de acuerdo sólo con la naturaleza de la fase estacionaria, dado que la fase móvil siempre es un gas. Estas clases son: la cromatografía gas-sólido (CGS), en la cual la fase estacionaria es un material adsorbente de tipo sólido y las partículas de soluto son extraídas de la fase móvil mediante fuerzas electrostáticas, y la cromatografía gas-líquido (CGL), en la cual la fase estacionaria es una delgada capa de líquido, usualmente uno que recubre la superficie de una partícula inerte. En este método las moléculas de soluto son retenidas en la fase líquida basadas en sus coeficientes de partición entre ella y la fase móvil gaseosa (17).

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

B.3.- FARMACOCINÉTICA

La Farmacocinética puede definirse como el estudio de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos relacionados con el tiempo que permanece el fármaco en el organismo o en uno o más de sus compartimientos (18).

Es el estudio de las cinéticas de absorción, distribución, metabolismo y excreción de drogas y sus correspondientes respuestas farmacológica, terapéutica o tóxica en animales y en el hombre (6).

Es el estudio de las drogas (fármaco) durante el movimiento a través del cuerpo (19).

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

Los parámetros farmacocinéticos que más comúnmente describen estos procesos son la concentración máxima en suero (Cmax), el tiempo en que esto ocurre (Tmax) y cuan rápidamente se elimina (la aparente vida media de eliminación). Adicionalmente se incluyen la dispersión de la droga en el cuerpo (volumen de distribución y la remoción de la droga del organismo (aclaramiento) (19).

PARÁMETROS FARMACODINÁMICOS

La interacción de una droga con un microorganismo puede ser descrito por la concentración bactericida mínima (MBC) y cinética de inhibición o muerte (curvas de tiempo de muerte). Estos pueden ser estudiados in vitro (agar o caldos), en modelos de macrófagos y potencialmente en animales o en humanos. La

farmacocinética o acción de la droga relacionada a los niveles en suero o tejidos de una droga a la cantidad necesaria para inhibir o matar el organismo alcanzando la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) o MBC. Los parámetros farmacodinámicos incluyen la Concentración Máxima (*Cmax)*, tasa de MIC, el tiempo en el cual de alcanza el MIC y el Área Bajo la Curva (AUC) encima del MIC (19).

ABSORCIÓN EN EL TUBO DIGESTIVO

Las drogas son administradas por diversas vías, que incluyen la intravenosa, intramuscular, inhalatoria, oral, rectal, vaginal y aplicación tópica sobre la piel. La elección de la vía de administración depende de numerosos factores relacionados con el paciente y con la droga (20).

La vía oral es la elegida más frecuentemente dada la facilidad de administración, el bajo costo y aceptación por el paciente. Sin embargo, el número de variables que intervienen en la absorción de drogas en el estómago e intestino delgado hacen que la vía oral resulte bastante compleja. La disminución en la biodisponibilidad de una droga oral puede deberse a su escasa absorción gastrointestinal, ya sea porque la droga no se disuelve totalmente o porque es degradada en el lúmen gastrointestinal o bien porque no atraviesa la mucosa intestinal (20).

La mayor parte de fármacos se absorben en el tubo digestivo por difusión lípida de molécula no ionizadas. Unos cuantos fármacos con pesos moleculares bajos se absorben bien por difusión acuosa (etanol). Las sustancias completamente ionizadas se absorben con lentitud y en forma incompleta; no obstante, puede

absorberse suficiente fármaco, probablemente por difusión acuosa, para producir efectos importantes (18).

Estudios realizados sugieren que la Rifampicina atraviesa la barrera hematoencefálica y alcanza niveles cuantificables en el líquido cefalorraquídeo (21). Esto sugiere que se puede usar la Rifampicina en el tratamiento de la tuberculosis meníngea tan pronto como se sospeche. Además, se alcanzan concentraciones constantes en el líquido cefalorraquídeo, aunque en el suero estas concentraciones fluctúan (22).

DESTINO DE LOS FÁRMACOS DESPUÉS DE SU ABSORCIÓN EN EL TUBO DIGESTIVO

METABOLISMO HEPÁTICO

Los fármacos absorbidos en el tubo digestivo que pasan al torrente sanguíneo son transportados primero por la circulación porta al hígado donde pueden ser captados y metabolizados por los hepatocitos o las células de Kupffer. El grado de reducción de la actividad de un fármaco por su paso a través del hígado puede demostrarse en animales comparando los efectos de la inyección prolongada en una vena sistémica con los de la inyección en la vena porta (18).

Se ha atribuído unos pocos casos de hepatitis a Rifampicina, los resultados de investigaciones sugieren que Rifampicina causa rápidamente una disminución considerable en la tasa de desaparición plasmática de Bromosulfaleína y un ligero aumento en la bilirrubinemia. Tal hecho sugiere un fenómeno de competencia como ha sido demostrado con otras drogas colefílicas. Teóricamente se sabe que la

hepatitis inducida por drogas y clasificada como "idiosincrática" es más frecuente en pacientes en los cuales hay un catabolismo insuficiente de la droga y quienes consecuentemente tienen elevadas concentraciones en suero para la misma dosis administrada. De allí que es lógico prescribir pequeñas dosis a pacientes que muestran modificaciones preexistentes de la función hepática. Además, tiene valor medir las concentraciones séricas de Rifampicina en pacientes que sufren cualquier insuficiencia hepática, ya que probablemente se alcancen concentraciones efectivas con dosis menores (23).

UNIÓN DE FÁRMACOS A LA ALBÚMINA PLASMÁTICA

Diversos fármacos tienen gran afinidad por la albúmina plasmática, y de ellos muchos no son fijados en grado importante por otros constituyentes tisulares. La unión suele ser reversible e incluye los tipos de uniones químicas que participan en las reacciones reversibles entre fármacos y receptores. Con los valores de pH del plasma, la albúmina tiene una carga aniónica neta (su punto isoeléctrico está en pH 4,9). La albúmina tiene gran capacidad, pero poca afinidad, para la mayor parte de fármacos catiónicos. Sin embargo, muchas sustancias ácidas se unen firmemente a la albúmina; varias de ellas manifiestan gran afinidad, pero los sitios de unión pueden tener poca capacidad (18).

Las enfermedades también pueden afectar la afinidad de las drogas por la albúmina. El ejemplo mejor conocido ocurre en la insuficiencia renal crónica, donde los complejos acumulados que no son debidamente eliminados por diálisis desplazan a drogas ácidas de su unión con las proteínas. En desórdenes o situaciones con

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

niveles aumentados de ácidos grasos libres, las drogas ácidas son desplazadas de sus sitios de unión con las proteínas (18).

ELIMINACIÓN DE FÁRMACOS

La principal vía de eliminación de fármacos y sus metabolitos es la orina; la siguiente en importancia son las heces. Las sustancias volátiles se eliminan principalmente con el aire espirado. Las pérdidas de fármacos por secreciones externas (sudor y leche) son cuantitativamente insignificantes, aunque su presencia en ellas puede tener consecuencias importantes. Los procesos metabólicos pueden afectarse por interacciones de fármacos y el ritmo de eliminación de muchos fármacos depende del pH urinario (18).

C.- CARACTERÍSTICAS DE LA RIFAMPICINA

También conocida como Rifamicina AMP (R/AMP), Rimactan, Rifadin, Rimactane, Rifalzadina y Rifampicina es un antibiótico semisintético, perteneciente a la familia de la Rifamicina. En 1957, una cepa de *Streptomyces mediterranei* fue aislada en los Laboratorios Lepetit, Milán, que producía en fermentación al menos 5 formas de un antibiótico, el cual fue designado como "Rifamycina". A partir de la rifamicina se semisintetiza la Rifampicina, la cual comenzó a usarse en 1969 en el National Jewish Hospital para el tratamiento de pacientes con tuberculosis avanzada de resistencia múltiple, además de usarse en pacientes con infecciones de Mycobacterias atípicas (24).

C.1.- PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Las propiedades biológicas de la Rifampicina fueron descritas en 1966 por Sensi y colaboradores, quienes reportaron los resultados de una investigación detallada de las hidrazonas de 3-formil rifamycina SV y demostraron claramente su eficacia in vitro por administración oral. El derivado más activo estudiado fue Rifampicina, la cual en exámenes comparativos con otros 10 agentes antimicrobianos mostró, ante infecciones estafilocócicas experimentales en ratones; valores Dosis Efectiva 50 (DE_{50}) mucho menores que los valores de otros agentes ensayados. El tiempo de supervivencia media de ratones infectados con *M. tuberculosis* y tratados oralmente con 5 mg de Rifampicina por kilogramo de peso corporal por día, comenzando 3 días después del inicio de la infección y continuando por 25 días, fue de 53 días en contraposición a los más de 100 días para ratones similarmente tratados con Isoniazida y 12 días para animales no tratados. Cuando se continuó el tratamiento con Rifampicina por 50 días, sin embargo, el tiempo de supervivencia media fue más de 100 días, como también lo fue para animales tratados con Isoniazida. Con esto pudo conocerce aparentemente las potencialidades de la Rifampicina en el tratamiento de la tuberculosis experimental (25).

Al siguiente año 1967, Arioli y sus asociados, Pallanza y colaboradores y Furesz y colegas en una serie de 3 reportes interrelacionados, presentaron datos que demuestran que :

i) La Rifampicina es altamente activa ante microorganismos Gram positivos ,especialmente *Staphylococcus pyogenes, Estreptococcus pyogenes, Estreptococcus*

viridans, Streptococcus pneumoniae, (*Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium leprae* son muy susceptibles a la droga). Presenta actividad variable contra *Haemophilus influenzae*, meningococos y gonococos, es activa en altas concentraciones ante microorganismos Gram negativos y muestran resistencia cruzada sólo con miembros de las 3 series de Rifamycina, no con otros agentes microbianos (25).

Algunos autores señalan que la Rifampicina inhibe el crecimiento de casi todas las bacterias grampositivas y de muchos microorganismos gramnegativos como *Escherichia coli, Pseudomonas, Proteus indol-positivos y -negativos y Klebsiella.* Es menos activa que la Penicilina G pero un poco más efectiva que la Eritromicina, Lincomicina y Cefalotina contra microorganismos grampositivos, definitivamente inferior a Tetraciclina, Cloranfenicol, Kanamicina y Colistina contra bacilos gramnegativos. La Rifampicina es muy activa contra *Staphylococcus aureus*; las concentraciones bactericidas son de 3 a 12 ng/ml. La droga también es muy activa contra *Neisseria meningitidis*; las concentraciones inhibitorias mínimas son de 0,1 a 0,8 ug/ml (26).

La Rifampicina inhibe in vitro al *Mycobacterium tuberculosis* a concentraciones de 0,005 a 0,2 ug/ml. Entre las mycobacterias atípicas *Mycobacterium kansasii* se inhibe con 0,25 a 1 ug/ml. La Rifampicina aumenta la actividad in vitro de la Estreptomicina y de la Isoniazida, pero no la del Etambutol, contra *M. tuberculosis* (26).

ii) Mantiene su actividad en presencia de suero o albúmina y no demuestra pérdida de actividad cuando se altera el pH.

iii) Es bactericida ante organismos en la fase logarítmica de crecimiento y efectiva in vivo ante infecciones experimentales debido a Staphylococcus, Streptococcus hemolítico y Pneumococcus (25).

iv) Es rápidamente absorbida luego de administración oral (25) y es eliminada lentamente , principalmente en la bilis (27).

v) Es muy activa ante cepas de *M. tuberculosis*, su concentración inhibitoria mínima varía con el medio de cultivo empleado.

vi) La concentración inhibitoria mínima ante cepas de *M. tuberculosis* no es afectada por el tamaño del inóculo, es bactericida ante bacilos tuberculosos en la fase logarítmica y es bactericida además (aunque en grado menor) ante células subyacentes (25).

Se asume a partir de las investigaciones realizadas que la aparición de microorganismos resistentes a la Rifampicina in vivo debe ser un problema importante. Debe asumirse, como sugieren Kunin y sus asociados, que además de estudios acerca de la aparente incapacidad de elevadas concentraciones de Rifampicina para eliminar células susceptibles aún cuando su capacidad de formar colonias sea reducida, es más efectiva en combinación con otros agentes antimicrobianos, aunque esto pueda enmascarar antagonismo o sinergismo entre la Rifampicina y otros antibacterianos (28,29,30).

C.2.- PROPIEDADES QUÍMICAS

La Rifampicina se deriva de la rifamicina, un producto de fermentación de *Streptomyces mediterranei sp* aislada en los Laboratorios Lepetit. Solamente la forma B de las cinco (B,O,S,SV y X) que producía este Streptomyces era producida en presencia de ácido barbitúrico dietílico y éste era oxidado rápidamente a rifamycina O, la cual sufría hidrólisis con pérdida del ácido glicólico y la formación de Rifamycina S. El producto reducido de Rifamycina S, denominado Rifamycina SV, poseía actividad ante *Mycobacterium tuberculosis* pero requería administración parenteral. La síntesis subsecuente de 3 formil rifamycina SV y su posterior reacción con 1-amino-4-metilpiperazina en tetrahidrofurano ayudó al desarrollo de una serie de derivados, siendo una de los más interesantes la hidrazona, 3- (4-metil piperazinil-iminometil) - rifamycina SV, ahora designada como "Rifampicina". La Rifampicina tiene como estructura base un grupo cromóforo naftohidroquinona extendido a lo largo de un puente alifático, que no se había encontrado anteriormente en otros antibióticos conocidos (31).

La Rifampicina tiene un peso molecular de 822,97, Carbono = 62,75 %, Hidrógeno = 7,1 % , Nitrógeno = 6,81 % , Oxígeno = 23,33 %. Es un polvo cristalino naranja - rojizo, estable a temperatura ambiente, soluble en Metanol, Cloroformo, Acetato de Etilo, Tetrahidrofurano, Acetona, Tetracloruro de carbono. Su solubilidad en agua es mediana alcanzando 0,28 % a pH = 7,5 . Es estable en DMSO Dimetilsulfóxido (DMSO). Se descompone a 183 -188°C. Muestra absorción máxima a (pH= 7,38) 237 , 255 , 334 y 475 nm. La Rifampicina es un "switterion"

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

con pKa de 1,7 relacionado al 4-OH y pKa de 7,9 relativo al nitrógeno 3-piperazina. La dosis letal 50 en ratones es de 885,1720 (mg/Kg) oralmente, 260, 330 iv, 640, 550 ip (25, 31).

Se denomina químicamente como 3((4-metil-1-piperazinil)imino)-metil) rifamicina, o como 5,6,17,19,21- hexahidroxi - 23 - metoxi - 2,4,12,16,18,20,22 - heptametil - 8 - (4-metil- 1- piperazinil) formimidoil)-2, 7 -(epoxipentodeca (1, 11, 12) trienimina) nafto (2, 1-b) furano- 1-11(2H)-dieno 21 acetato (31).

La Rifampicina imparte un color rojo-anaranjado a la orina, las heces, saliva, esputo, lágrimas y sudor (26).

C.3.- FARMACOCINÉTICA

Se absorbe rápidamente luego de la administración oral, las concentraciones pico en plasma se alcanzan a las 2 a 4 horas luego de una dosis única. Se distribuye en todos los tejidos y fluidos para luego pasar por la circulación enterohepática. Se metaboliza a Desacetilrifampicina excretada en la bilis y orina. Este metabolito conserva esencialmente toda su actividad antibacteriana. Otros metabolitos son Rifampicinquinona, 3-Formilrifamicin SV, Desacetilrifampicinquinona, 3-Formil-desacetilrifamicina SV. La mayor parte del antibiótico en la bilis se encuentra desacetilado después de 6 horas. La reabsorción intestinal se reduce por desacetilación además de los alimentos, facilitando de este modo la eliminación de la droga. La administración prolongada de Rifampicina produjo una remarcable disminución en el nivel sanguíneo, tiempo de vida media y en la concentración total en orina de 24 horas (26, 32, 1).

El tiempo de vida media fluctúa entre 2 a 6 horas (dependiendo de la dosis), disminuyendo durante el dosaje crónico y aumentando en sujetos con enfermedad hepática. Este tiempo puede disminuir en pacientes que reciben Isoniazida y son además inactivadores lentos. Hay una disminución de la vida media de la Rifampicina en cerca del 40% en los 14 días iniciales de tratamiento debido a mayor excreción biliar (32, 26).

El volumen de distribución es de 1 L/Kg. Se une al plasma en aproximadamente 80%. La dosis es usualmente de 600 mg/día (32).

La Rifampicina se distribuye por todo el organismo y está presente a concentraciones efectivas en muchos órganos y líquidos biológicos incluyendo el Líquido Cefalorraquídeo (LCR). Hasta el 30% de la droga administrada se excreta por la orina y aún la mitad de la misma puede ser antibiótico no alterado (26):

DROGA: RIFAMPICINA.

suero : Cmax : 8 a 24 ug/ml.

suero : Tmax : 2 horas.

suero normal : vida media : 2 a 4 horas.

penetración en el LCR : 5 a 20% aproximadamente (varía según la inflamación).

unión a proteínas : 60 a 89% aproximadamente(aprox.).

Volumen de distribución : 0,6 a 1,0 L/Kg aprox.

Porcentaje de excreción renal : 10% , 16 +/- 4%.

porcentaje de aclaramiento hepático : 90%.

aclaramiento : 8,8 +/- 0,9 ml/min.kg.



metabolito activo : 25-o-deacetilrifampicina.

excreción del metabolito : 20% renal y no renal (19,26).

concentración inhibitoria mínima(CIM) : 0,1-0,5 microgramos por mililitro (ug/ml) (33).

MONITOREO TERAPÉUTICO DE RIFAMPICINA

El monitoreo terapéutico de drogas permite integrar los parámetros antes descritos en un plan de tratamiento optimizado. Afortunadamente, las dosis estándares de Rifampicina trabajan muy bien para la mayoría de los pacientes con TBC susceptible a drogas. Estos pacientes generalmente absorben las drogas normalmente, produciendo buen Cmax: tasa de MIC y tiempos prolongados encima del MIC, particularmente para Isoniazida y Rifampicina (19).

C.4.- FARMACODINAMIA

MECANISMO DE ACCIÓN

La Rifampicina posee acción ante algunos virus y parece ser una de las pocas drogas conocidas que pueden bloquear el crecimiento viral sin dañar las células sanas (34,35,26).

La actividad antimicrobiana de la Rifampicina ha sido atribuida al anillo macrocíclico en la subunidad beta de la molécula de Rifamycina SV el cual parece afectar la iniciación de la formación de la cadena en la síntesis del ácido ribonucleico (ARN) pero no inhibe la elongación de la cadena. El mecanismo de resistencia a rifampicina no depende del desarrollo de una barrera a la droga, pero sí

en un posible cambio en la conformación de la polimerasa del ARN dependiente del ácido desoxirribonucleico (ADN) (34, 35 ,26).

La Rifampicina no es la única droga que inhibe esta enzima, ejercen este mismo mecanismo la Actinomicina, Mitramicina, Cromomicina y Nogalamicina pero sólo la Rifampicina parece no interferir con la RNA polimerasa de las células de mamíferos (25). Se necesitan concentraciones mucho mayores de droga para obtener algún efecto sobre ellas (26). Además, hay varios inhibidores específicos de la polimerasa RNA como Alfaamanitina, Aflatoxina y Estreptovaricina, al igual que Rifampicina, pero sólo Estreptovaricina y Rifampicina son poco tóxicos para permitir el uso clínico (25).

ADMINISTRACIÓN Y DOSIS

La administración generalmente es oral, en algunas investigaciones[1] se inyectó la Rifampicina, dependiendo de la enfermedad.

Las dosis varían de 450 a 600 mg para pacientes con menos de 50 y mayores de 50 Kg respectivamente (36, 37, 38). En la mayoría de artículos se reporta[2] una dosis oral diaria de 600 mg (1, 39) ó cada dos días[3]. En un estudio se reporta una dosis de 100, 120 y 150 mg de Rifampicina interdiaria y diaria respectivamente junto con otros antibióticos (40, 41). El dosaje de tóxicos intracelulares como Rifampicina debe mejorarse dando elevadas dosis intermitentemente (19).

---

[1] Shakif-A. Treatment of tuberculous epididymitis by intratunical by injection. En: Arch. Androl. 36:3:239-246, 1996.
[2] Tur E. Brenner S. Meyron Y. Scrofuloderma (tuberculosis colliquativa cutis). En: Br. J. Dermatol. 134:2:350-352, 1996.
[3] China Tuberculosis Control Collaboration. Results of directly observed short-course chemotherapy in 112842 chinese patients with smear-positive tuberculosis. En: Lancet 347:8998: 358-362, 1996.

EFECTOS ADVERSOS DE LA RIFAMPICINA

La Rifampicina no causa efectos indeseables con gran frecuencia. Las alteraciones hepáticas son más frecuentes entre los pacientes tratados con Rifampicina e Isoniazida que entre los tratados con Rifampicina y Etambutol. La edad avanzada, la ingesta regular de alcohol y una historia de enfermedad hepatobiliar también aumentan el riesgo de hepatitis con la combinación Rifampicina-Isoniazida (33, 26).

Los efectos indeseables son alteraciones gastrointestinales (náuseas y vómitos) y durante las primeras semanas de tratamiento, elevaciones menores de la bilirrubina y de las transaminasas que no impiden proseguir el tratamiento, porque generalmente son reversibles y transitorias; también la orina y en ocasiones el esputo y el sudor adquieren un color anaranjado-rojo. A veces suceden reacciones eritematosas (rash), reacciones sobre el sistema nervioso central que incluyen fatiga, cefálea, ataxia, gripe, etc. (33, 26).

Son pocos los casos registrados de púrpura, generalmente tras administración intermitente de la droga. Ocurre síndrome gripal y, con menor frecuencia, dificultad respiratoria, raramente anemia hemolítica aguda e insuficiencia renal con las pautas de administración intermitente, generalmente de dosis elevadas. La inducción enzimática causada por la Rifampicina reduce los efectos de los tratamientos simultáneos. Las interacciones clínicamente importantes son la disminución de los efectos de los contraceptivos, anticoagulantes e hipoglucemiantes orales (33,26).

III.- PARTE EXPERIMENTAL

OBJETIVO

1.- Modificación, Estandarización y Determinación de la Curva Estándar del método de Sunahara y Nakagawa utilizado para la extracción, cualificación y cuantificación de Rifampicina y sus metabolitos en orina de 24 horas de niños con tuberculosis.

POBLACIÓN EN ESTUDIO

Muestra de orina de niño sano.

Doce niños pacientes con tuberculosis del Área de Neuropediatría del Instituto Nacional de Salud del Niño, medicados con la misma especialidad farmacéutica conteniendo Rifampicina, en dosis diaria equivalentes a 10 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso, quienes se encontraban en condiciones de proporcionarnos la muestra.

MUESTRAS DE ESTUDIO

Orina excretada durante las 24 horas después de ingerir una dosis diaria de Rifampicina de 10 mg/Kg de peso.

MATERIALES, REACTIVOS,EQUIPOS Y MÉTODOS

i) Materiales y reactivos.-

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Reactivos.-

* metanol P.A.

* hidróxido de sodio 5%.

* agua destilada USP.

* ácido clorhídrico 10%.

* silicagel para cromatografía.

* cloroformo P.A.

* reactivo de Van Urk (32).

* reactivo de vainillina (32).

Materiales.-

* beakers de 50, 100 y 200 ml.

* matraces aforados de 10 , 50 , 100 y 250 ml.

* embudos de separación 100 y 250 ml.

* baguetas de vidrio.

* tubos de ensayo de 13 x 100 y 15 x 120.

* pipetas 0,1 ; 0,2 ; 1 ; 2 ; 5 y 10 ml.

* pipeta automática.

* tips accesorios de pipeta automática.

* papel de filtro.

* gradilla portatubos de acero.

* placas de vidrio de 20 x 20 cm.

* papel indicador UNIVERSALINDIKATOR pH 0-14.

* picetas.

* cubas cromatográficas.

* rociador de vidrio para reactivos.

Equipos.-

* espectrofotómetro " Shimatzu".

* lámpara UV "UVP".

* campana de seguridad "Labconco".

* plancha calentadora.

* agitador magnético con termostato.

* estufas "Memmert".

METODOLOGÍA

A.- TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra se realizó recolectando toda la orina excretada durante las 24 horas luego de la ingesta de Rifampicina, de la misma especialidad farmacéutica.

Las muestras se analizaron luego en las instalaciones del Laboratorio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal del Ministerio Público.

B.- MÉTODO ANALÍTICOS

B.1.- *Métodos Analíticos de Extracción*

a) Método de Sunahara y Nakagawa

Este método consiste en tomar una alícuota de 2 ml de orina (diluída o no diluída) y mezclarla con 1 ml de buffer fosfato (pH 7), procediéndose luego a extraer con 2 ml de alcohol isoamílico (1).

Estudios preliminares de extracción de Rifampicina y sus metabolitos.- Para lograr una técnica estandarizada que nos permita cualificar la Rifampicina y sus metabolitos se realizaron los siguientes estudios preliminares:

1) Se realizó pruebas para determinar el solvente adecuado de extracción ya que la adquisición del alcohol isoamílico tuvo inconvenientes. Con este fin se ensayó con éter etílico y cloroformo (tabla 1).

2) Se determinó el sistema de solventes de elusión cromatográfica a utilizar. Se ensayó varios sistema con los cuales se eluyó la Rifampicina estándar. Se obtuvo mejores resultados con el sistema utilizado por Sunahara y Nakagawa. (metanol : cloroformo (17:3)) ya que también separó los metabolitos de la Rifampicina en orina cuando se eluyó el extracto metanólico (tabla 2).

3) Se determinó el pH óptimo de extracción graduando soluciones de orina que contenían Rifampicina metabolizada a pH de 2, 3, 4, 5, 7, 9 y 12 (tabla 3).

b) Técnica Modificada para la Extracción de la Rifampicina y sus metabolitos.-

b.1) Para la realización de este técnica se utilizó una alícuota de 10 ml de orina a la cual se agregó 40 ml de agua destilada. Luego se mezcló con una bagueta de vidrio y se procedió a cambiar el pH de la dilución de la muestra con ácido clorhídrico al 10 % hasta pH 5.

Posteriormente en un embudo de separación conteniendo la dilución de la muestra se agregó 100 ml de cloroformo y se agitó las dos fases de tal forma que no se produjo emulsión. Se dejó reposar por 10 minutos y luego se separó la fase clorofórmica conteniendo la Rifampicina y sus metabolitos.

b.2) La fase clorofórmica de Rifampicina se evaporó a una temperatura de 80°C de tal forma que no se alteró la muestra.

Luego se reconstituyó la Rifampicina con 10 ml de alcohol metílico y se separó en porciones de 5 ml, la primera porción se sembró en placas cromatográficas de 20x20 cm y se eluyó en un sistema de solventes compuesto por metanol : cloroformo (17:3). En estas placas pudo observarse la Rifampicina y sus metabolitos (Cromatograma 1 y 2).



B.2.- *Métodos Analíticos de Cuantificación*

a) Método de Sunahara

Este método consiste en tomar una alícuota de orina de 2 ml (diluída o no diluída) y mezclarla con 1 ml de buffer fosfato (pH 7) para luego extraer con 2 ml de alcohol isoamílico. Se realiza la lectura a una longitud de onda de 475 nm en un espectrofotómetro.

Estudios preliminares de cuantificación de Rifampicina y sus metabolitos.-

1) Luego que se observó que los mejores resultados de extracción se obtuvieron con cloroformo, se trató de realizar la curva de trabajo directamente en este solvente (gráficos 1,2 y 3).

2) Al no poder realizar las mediciones directamente se evaporó con cuidado el cloroformo y se reconstituyó la muestra diluída con metanol. Se analizó la curva espectral de Rifampicina en este solvente utilizando como blanco metanol (gráficos 4,5,6,7,8,9 y 10) y orina blanco (gráficos 11 y 12).

3) Se escaneó el espectro de absorción de la Rifampicina en metanol en un rango de longitud de onda de 200 hasta 800 nm y se determinó la longitud de onda de lectura adecuada de Rifampicina.

4) Se realizó una extracción utilizando orina sin Rifampicina (orina blanco) según nuestra método modificado y así obtener el espectro de absorción en el mismo rango de longitud de onda para la orina blanco (gráficos 13 y 14).

5) Se escaneó el metanol para determinar su espectro de absorción comparado con agua (gráfico 15).

6)Curva Estándar.- La curva estándar se preparó añadiendo 0,1 , 0,25 , 0,5 , 2,5 , 5 , 7,5 , 10 , 15 , 25 , 40 , 50 ml de una solución de 200 ml cuya concentración de Rifampicina era de 20 microgramos por mililitro (ug/ml) a fiolas cuyo volumen final era de 10 ml , de tal manera que las concentraciones finales que se obtuvieron fueron de 0,2 , 0,5 , 1 , 5 , 10 , 15 , 20 , 30 , 50 , 80 , 100 ug/ml completados con metanol. Luego se procedió a leer las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 475 nm. (gráficos 16,17 y 18 y tablas 4,5 y 6 respectivamente).

7)Curva de Trabajo.- Esta curva de trabajo se preparó añadiendo 2,5 , 5 , 10 , 20 , 30 , 40 y 50 ml de una solución metanólica de 200 ml cuya concentración de Rifampicina era de 20 ug/ml a seis beakers conteniendo orina sin Rifampicina de tal manera que las concentraciones de Rifampicina sean de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ug/ml con un volumen total de 10 ml completados con la orina de niño sano sin Rifampicina. Luego se procedió a extraer la Rifampicina siguiendo la técnica modificada de cuantificación y se determinó las lecturas a una longitud de onda de 475 nm en el espectrofotómetro (gráficos 19,20,21,22,23,24,25 y 26 y tablas 7,8,9,10,11,12,13 y 14 respectivamente).

b) Método Modificado de cuantificación de Rifampicina y sus metabolitos.-

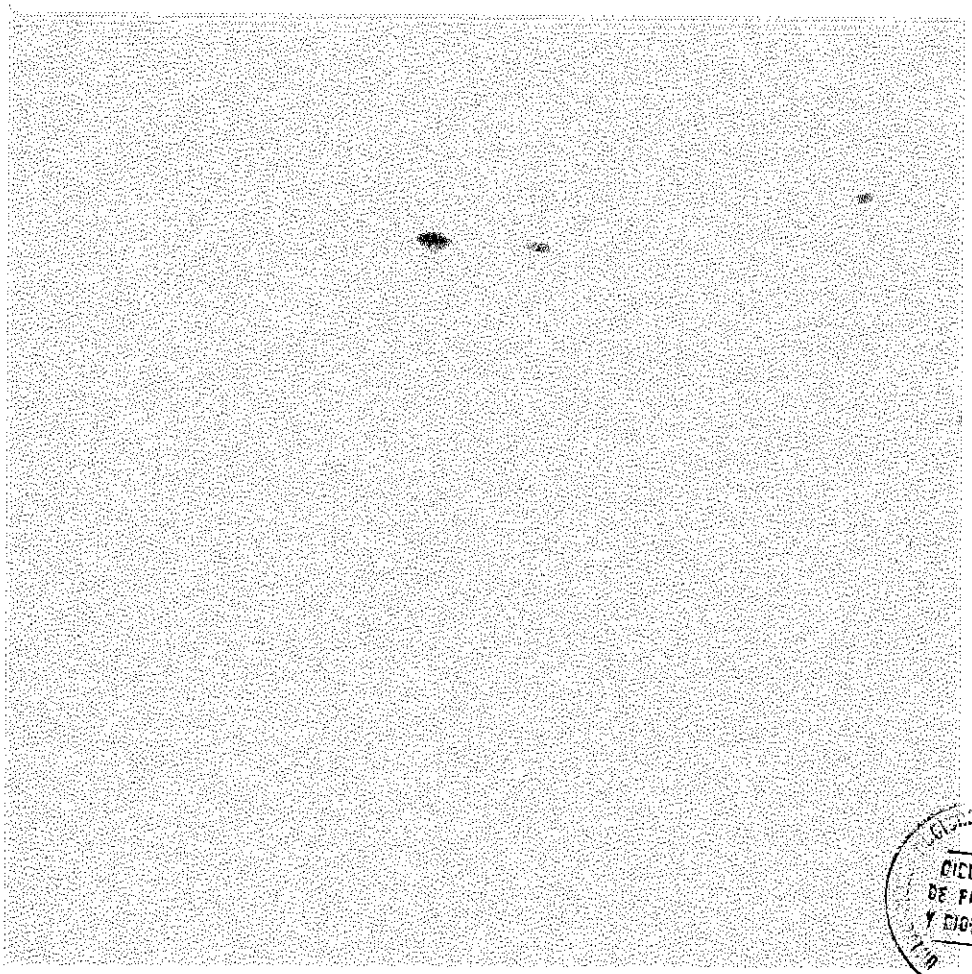
b.1) Para la realización de esta técnica se utilizó una alícuota de 10 ml de orina a la cual se agregó 40 ml de agua destilada. Luego se mezcló con una bagueta de vidrio y se procedió a cambiar el pH de la dilución de la muestra con ácido clorhídrico al 10% hasta pH 5.

Posteriormente en un embudo de separación conteniendo la dilución de la muestra se agregó 100 ml de cloroformo y se agitó de tal forma que no se produjo emulsión, se dejó reposar por 10 minutos y se separó la fase clorofórmica conteniendo la Rifampicina. Luego se evaporó la solución clorofórmica a una temperatura de 80°C de tal forma que no se alteró la muestra.

Se reconstituyó la Rifampicina con 10 ml de alcohol metílico y se separó en porciones de 5 ml. Luego la segunda porción de 5 ml que se obtuvo se llevó a lectura al espectrofotómetro, donde previamente se encontraba almacenada la curva de trabajo promedio; y se determinó la lectura de la concentración de Rifampicina en la muestra diluída. Luego de hacer las conversiones se obtuvo la concentración final. Como blanco se utilizó metanol. Los resultados se presentan en la tabla 15.

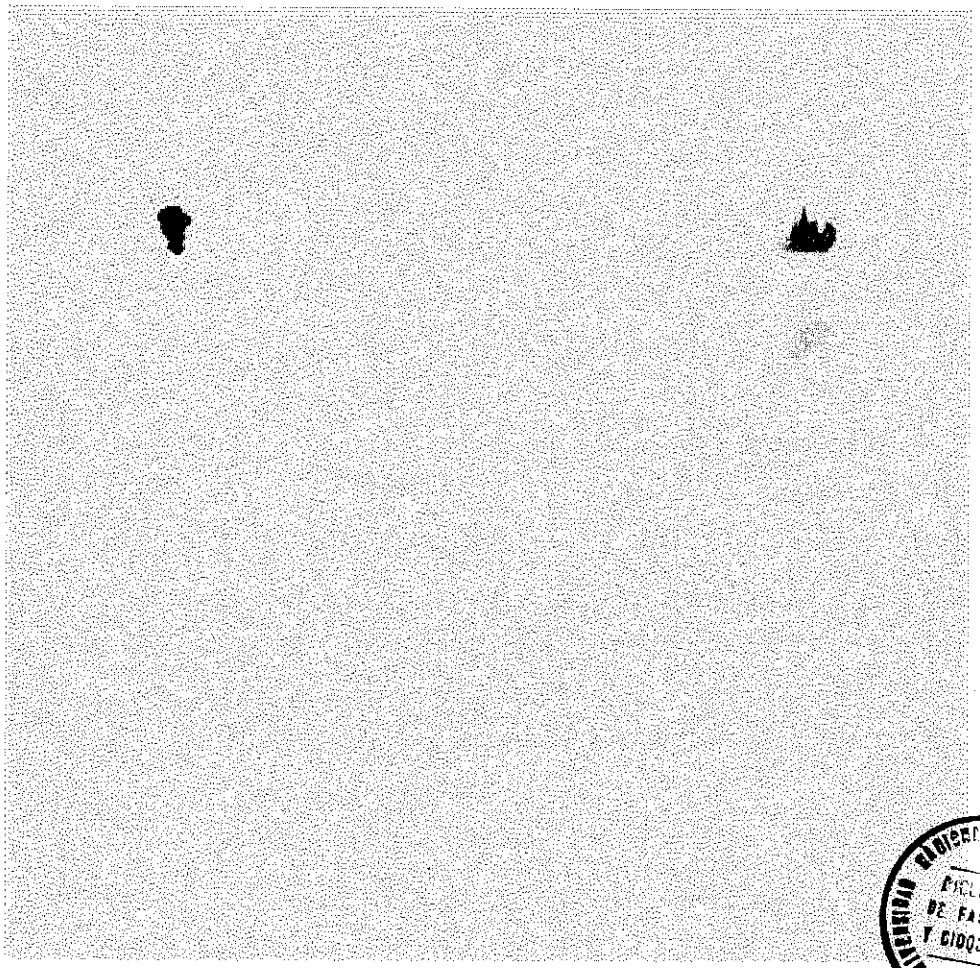
IV.- RESULTADOS

CROMATOGRAMA 1



MUESTRA 1 MUESTRA 2 ESTÁNDAR DE RIFAMPICINA

CROMATOGRAMA 2



ESTÁNDAR
DE
RIFAMPICINA

MUESTRA 3

Tabla 1

TABLA DE SOLVENTES DE EXTRACCIÓN

SOLVENTE	RESULTADO
Alcohol Isoamílico	bueno
Cloroformo	bueno
Éter	regular

Tabla 2

TABLA DE SISTEMAS DE ELUSIÓN

SOLVENTES	PROPORCIÓN	RESULTADO
Metanol:Cloroformo	3;17	muy bueno
Amoníaco:Metanol	15;100	bueno
Metanol:Acetona	1;1	malo
Metanol:Acetona:Cloroformo	3;2;15	malo
Cloroformo:Metanol:n-Hexano	85;15;5	regular

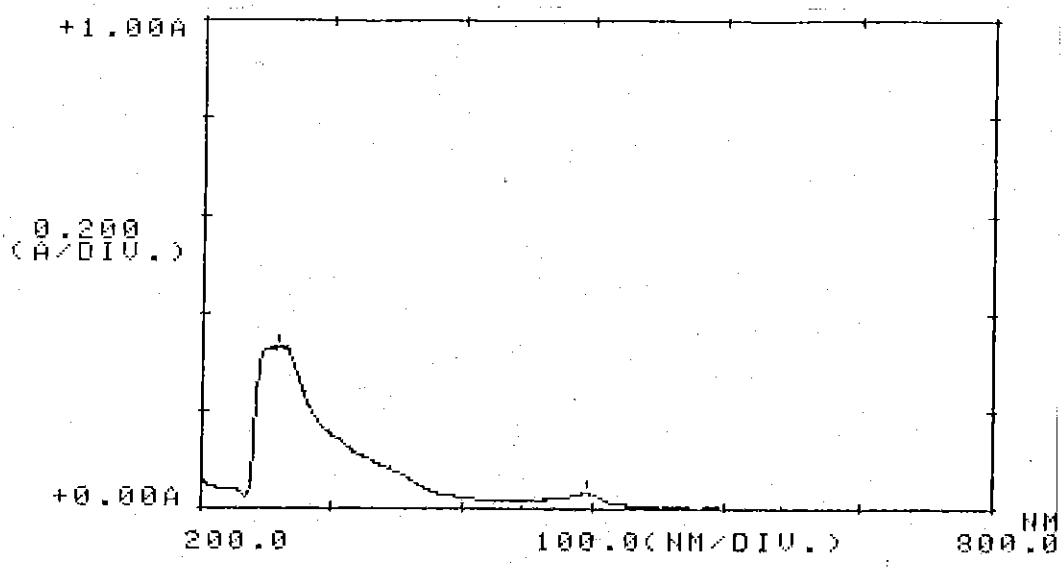
Tabla 3

TABLA DE pH ÓPTIMO DE EXTRACCIÓN

pH	RESULTADO
2	poco
3	regular
4	regular
5	muy bueno
7	regular
9	regular
12	regular

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE RIFAMPICINA EN CLOROFORMO

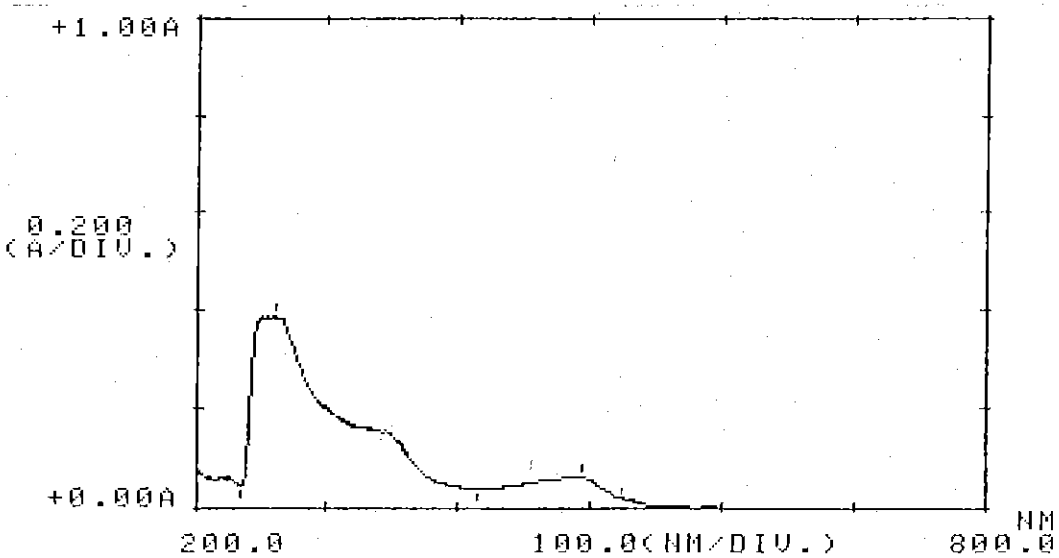
Gráfico 1



λ	ABS	λ	ABS
496.0	0.032	711.0	0.000
258.0	0.332	445.0	0.017

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

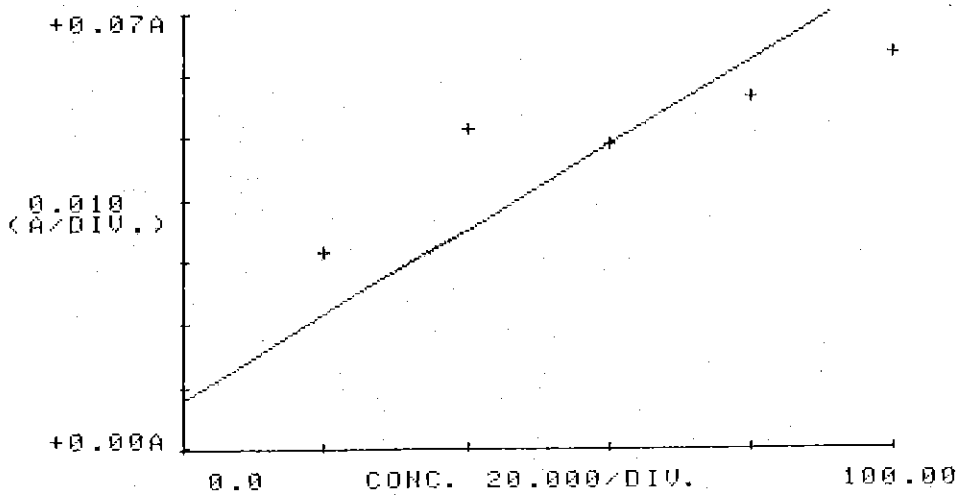
Gráfico 2



λ	ABS	λ	ABS
493.0	0.064	678.0	0.000
260.0	0.388	416.0	0.037
		234.0	0.043

Gráfico 3

CURVA DE RIFAMPICINA EN CLOROFORMO



No.	CONC.	ABS.
1	0.0000	0.000
2	20.000	0.032
3	40.000	0.051
4	60.000	0.049
5	80.000	0.056
6	100.00	0.063

ESPECTROS DE RIFAMPICINA USANDO COMO BLANCO METANOL

Gráfico 4

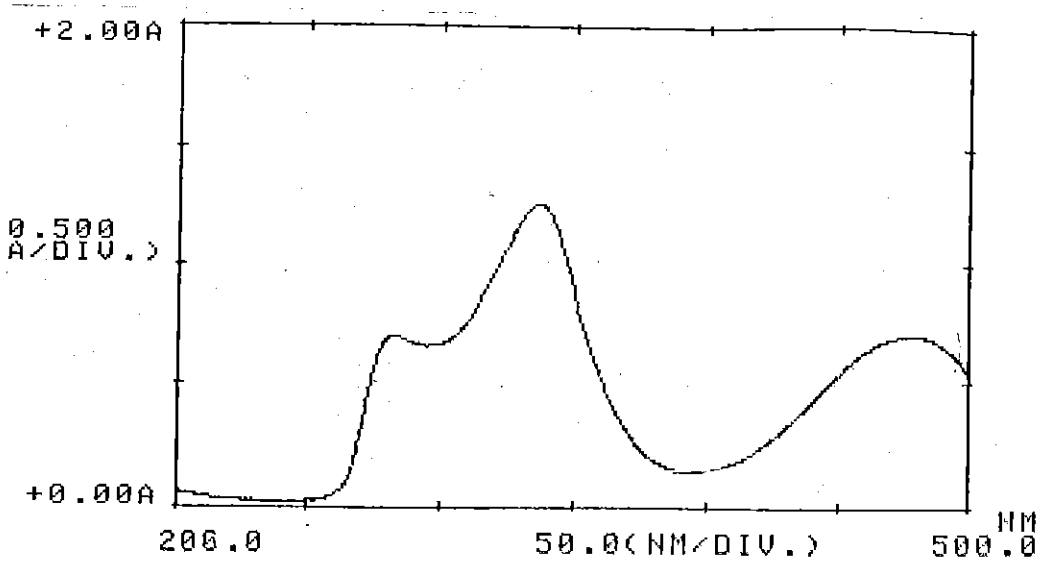


Gráfico 5

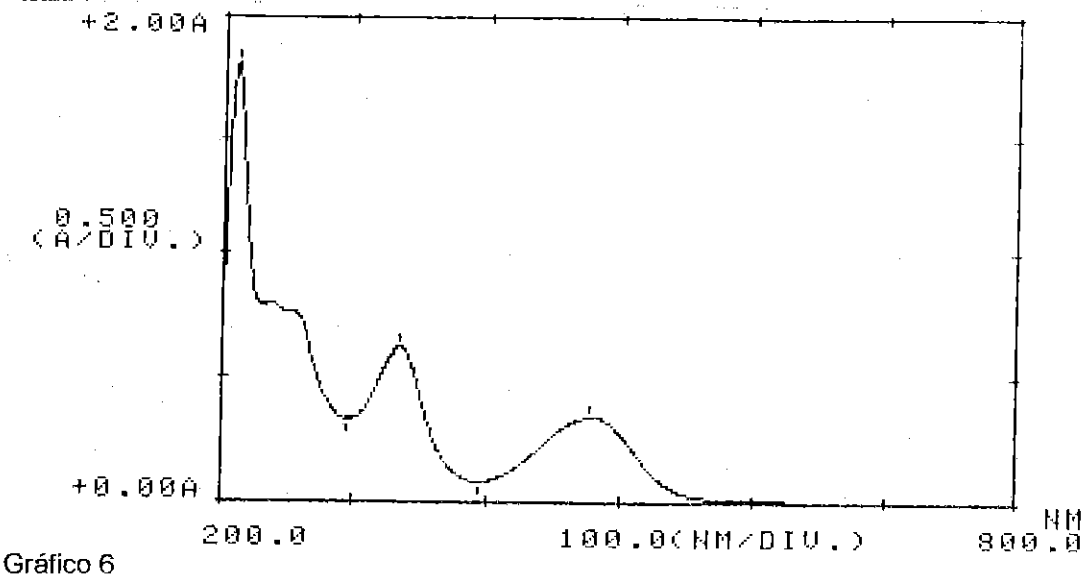
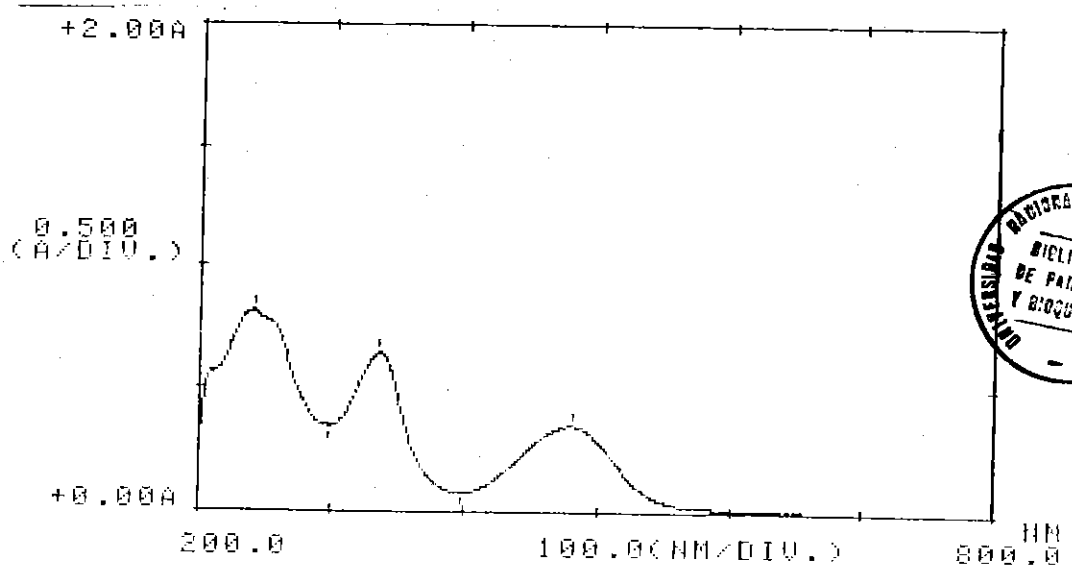


Gráfico 6



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

ESPECTROS DE RIFAMPICINA USANDO COMO BLANCO METANOL

Gráfico 7

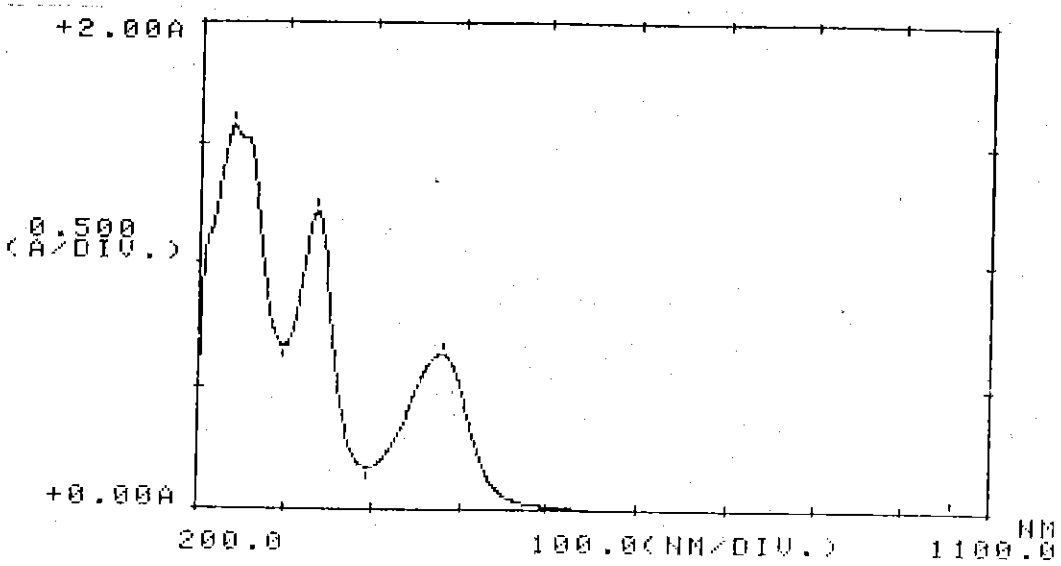


Gráfico 8

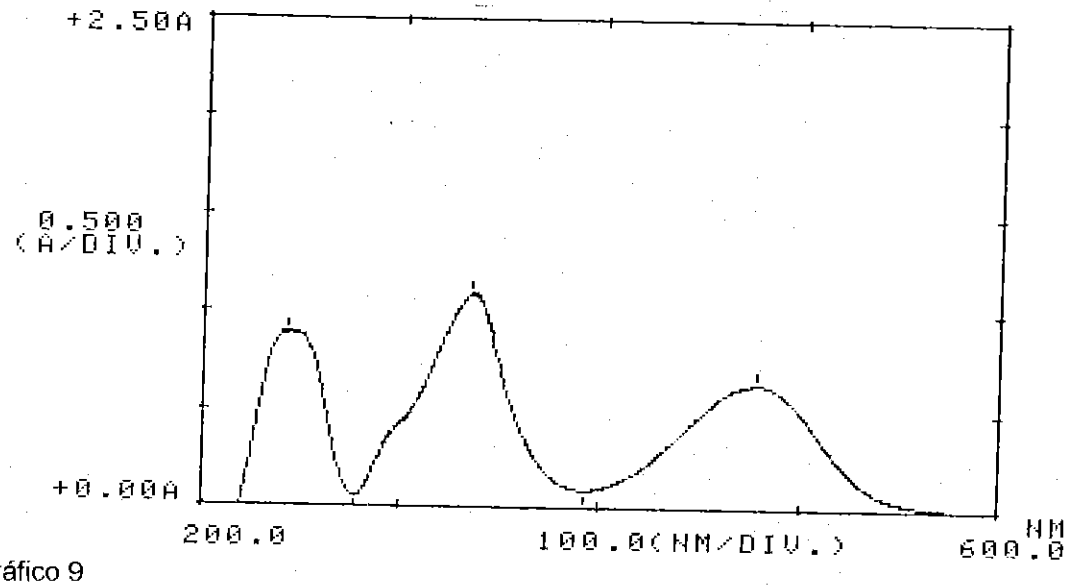


Gráfico 9

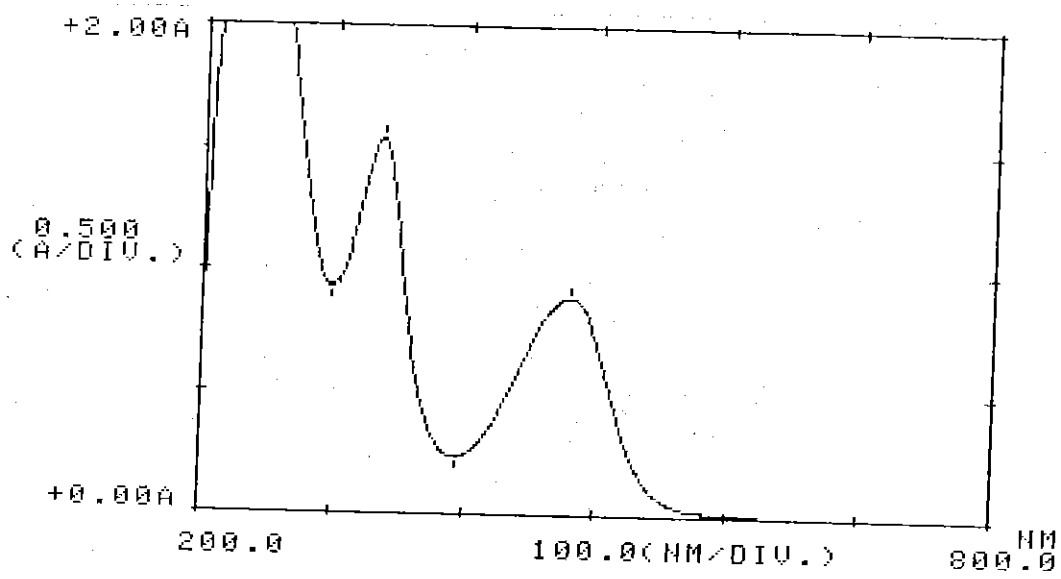
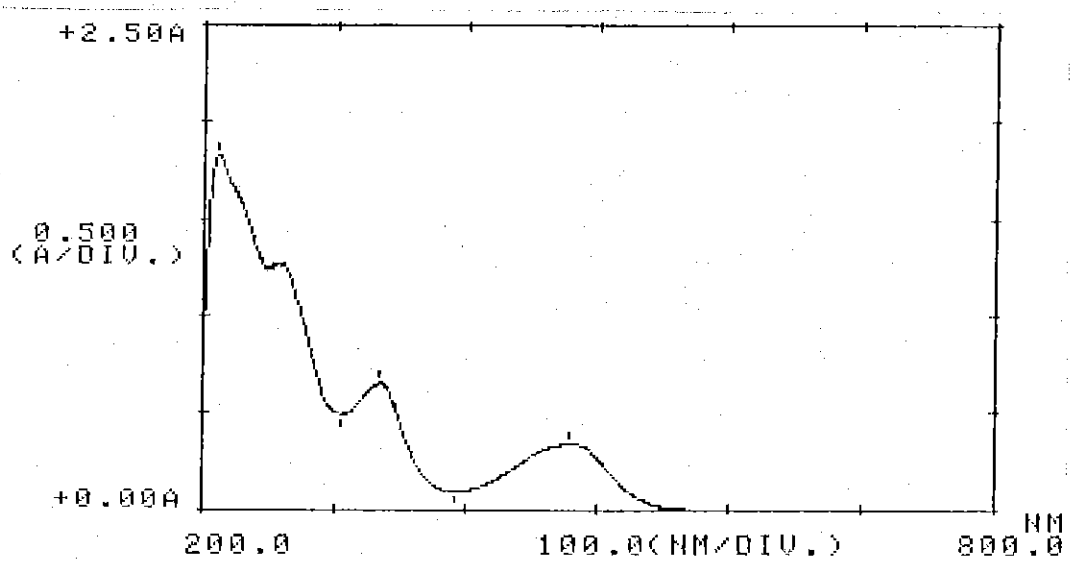


Gráfico 10

ESPECTRO DE RIFAMPICINA USANDO COMO BLANCO METANOL

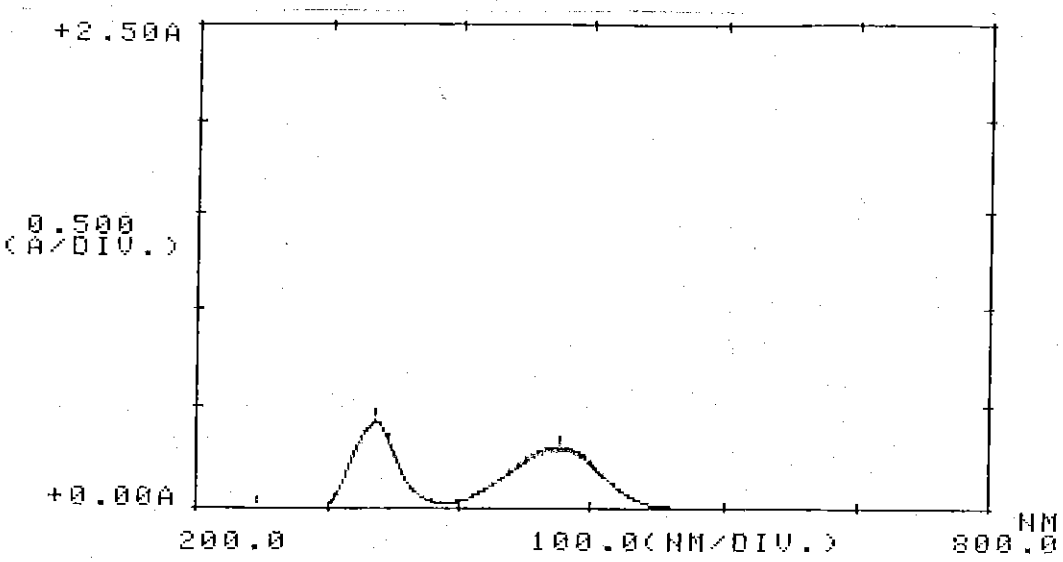
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



λ	ABS	λ	ABS
479.0	0.341	728.0	-0.002
334.0	0.653	392.0	0.097
211.0	1.836	304.0	0.484

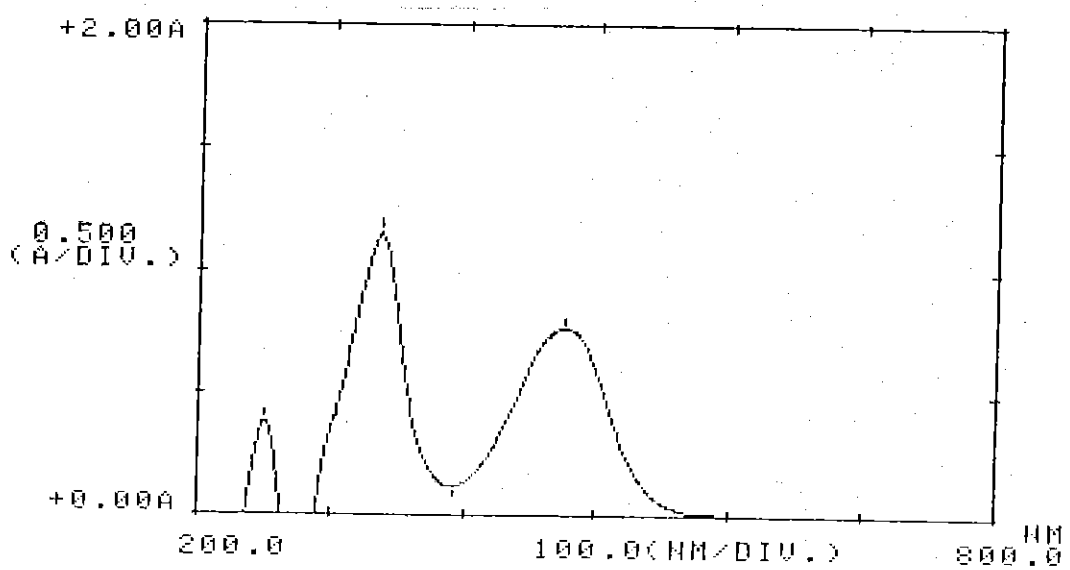
ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE RIFAMPICINA USANDO COMO BLANCO ORINA BLANCO

Gráfico 11



λ	ABS	λ	ABS
476.0	0.289	387.0	0.028
336.0	0.423	273.0	-0.537
246.0	-0.042	218.0	-0.712

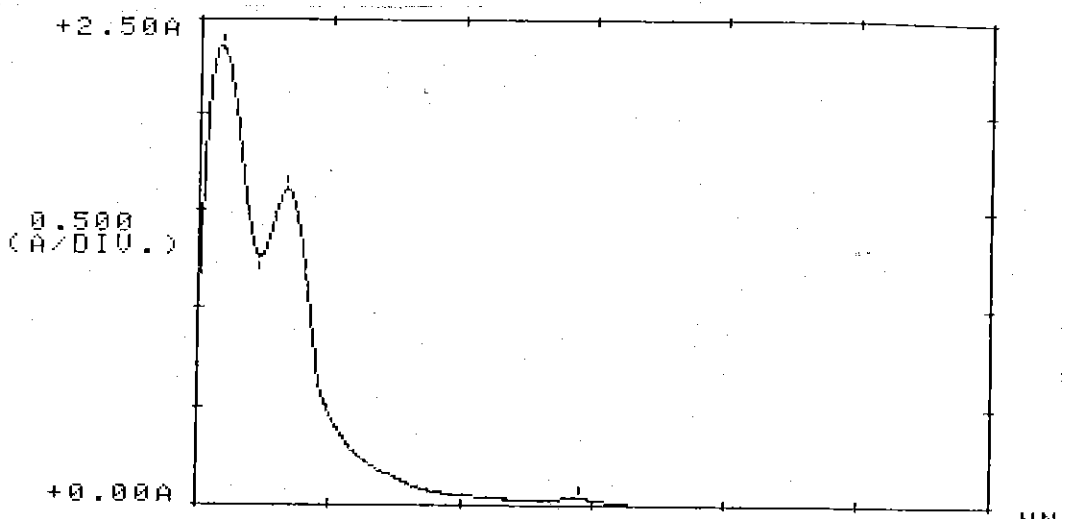
Gráfico 12



λ	ABS	λ	ABS
476.0	0.771	392.0	0.123
337.0	1.163	276.0	-0.466
251.0	0.391	219.0	-0.519

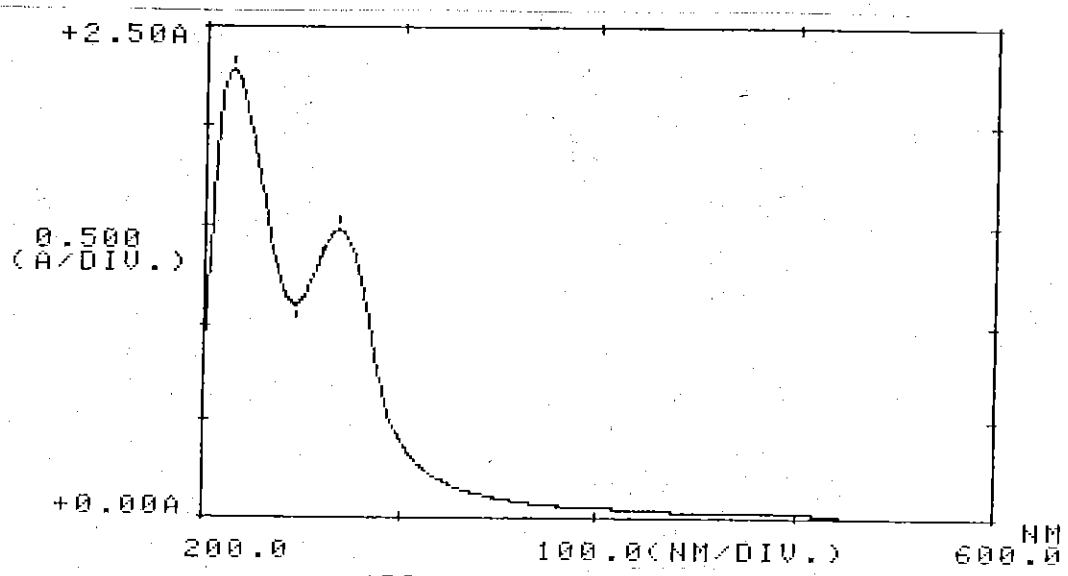
ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE ORINA BLANCO EXTRAÍDOS SEGÚN NUESTRO MÉTODO MODIFICADO

Gráfico 13



λ	ABS	λ	ABS
488.0	0.042	735.0	-0.001
268.0	1.616	459.0	0.032
216.0	2.359	247.0	1.252

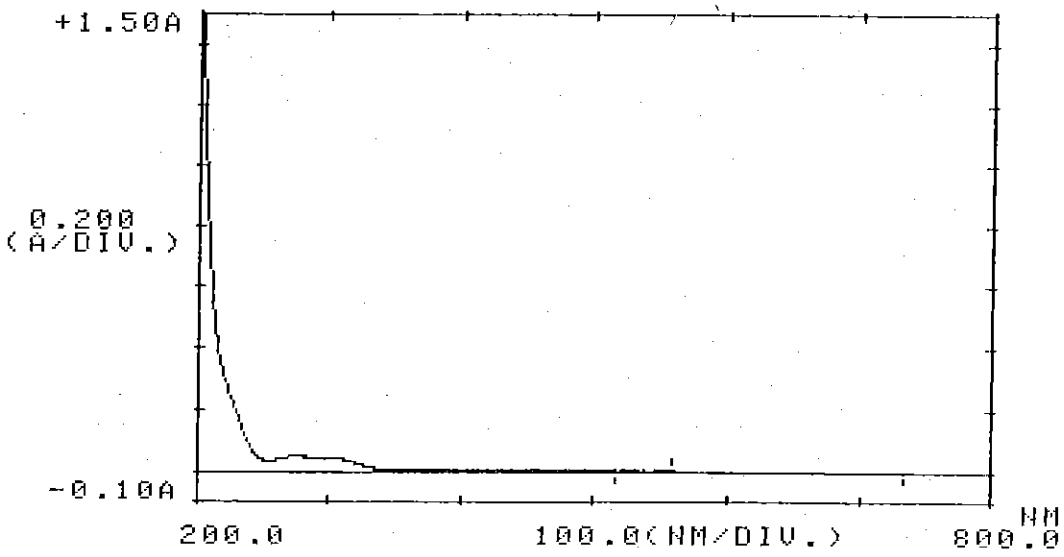
Gráfico 14



λ	ABS	λ	ABS
268.0	1.483	579.5	-0.002
213.5	2.290	247.0	1.104

Gráfico 15

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE METANOL USANDO AGUA COMO BLANCO



λ	ABS	λ	ABS
557.0	0.006	733.0	-0.004
		516.0	0.005

CURVAS ESTÁNDAR DE RIFAMPICINA

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Tabla 4

CONC.	ABS.
0.2000	0.013
0.5000	0.020
1.0000	0.030
5.0000	0.122
10.000	0.231
15.000	0.342
20.000	0.457
30.000	0.670
50.000	1.111
80.000	1.802
100.00	2.189

Gráfico 16

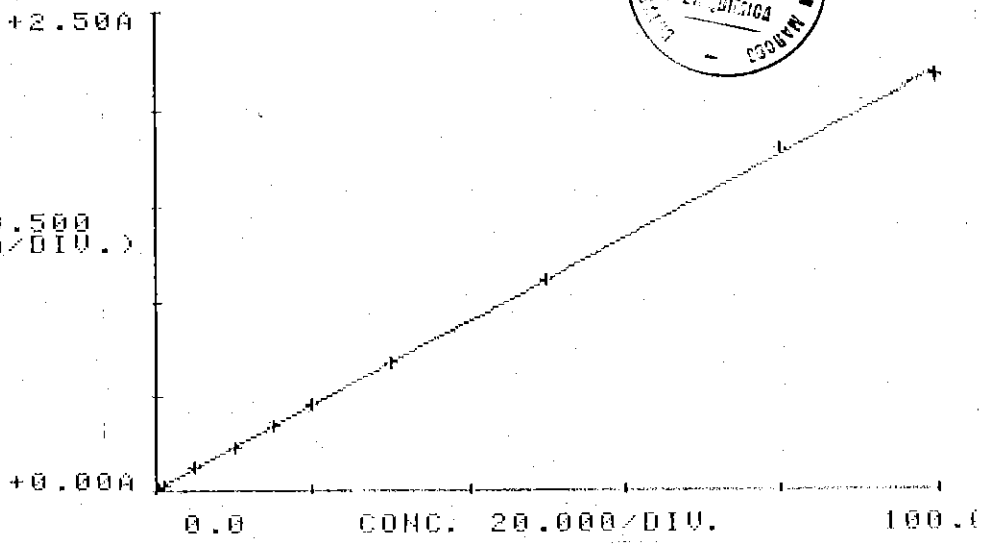


Tabla 5

CONC.	ABS.
0.2000	0.011
0.5000	0.020
1.0000	0.030
5.0000	0.124
10.000	0.232
15.000	0.343
20.000	0.459
30.000	0.673
50.000	1.110
80.000	1.814
100.00	2.171

Gráfico 17

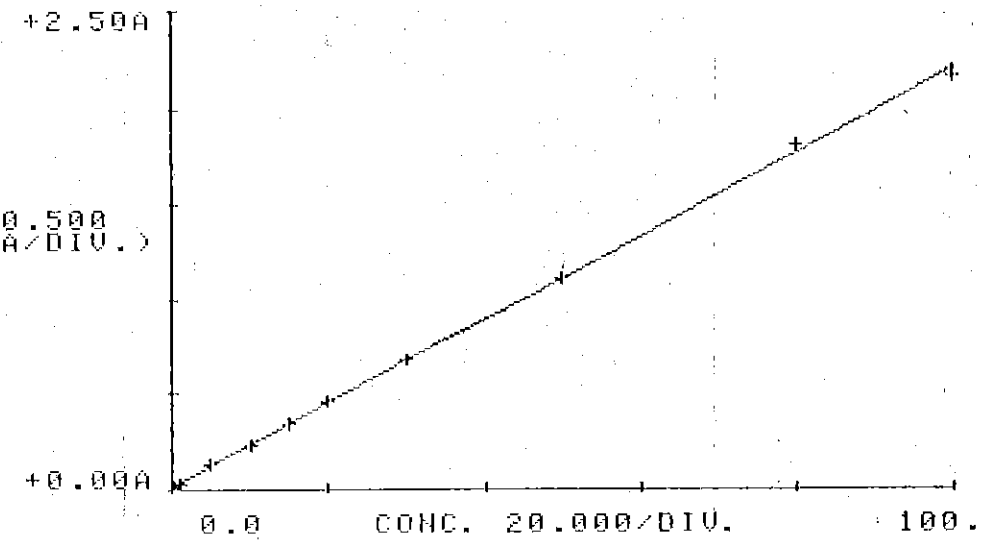
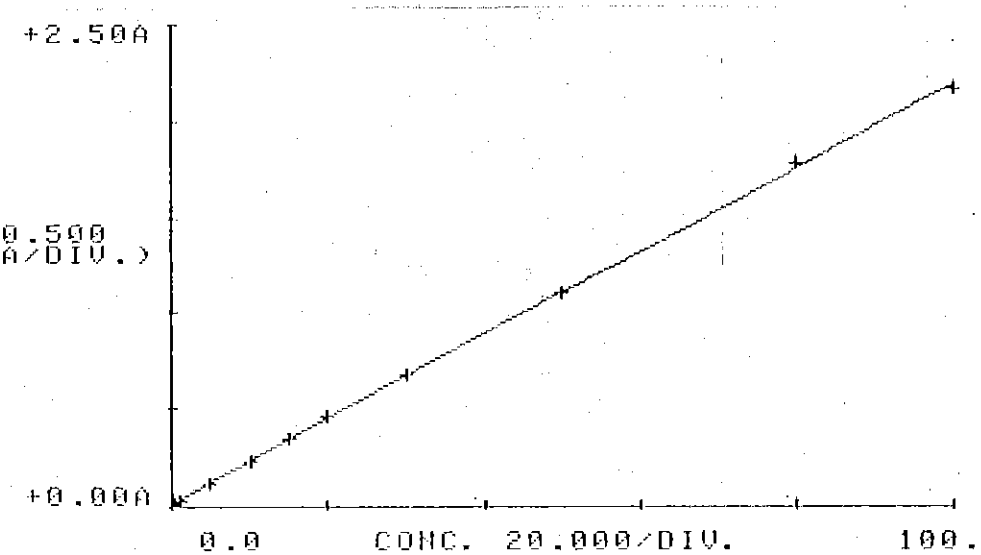


Tabla 6

CONC.	ABS.
0.2000	0.011
0.5000	0.017
1.0000	0.029
5.0000	0.119
10.000	0.229
15.000	0.335
20.000	0.453
30.000	0.664
50.000	1.099
80.000	1.787
100.00	2.174

Gráfico 18



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

CURVAS DE TRABAJO DE RIFAMPICINA

Gráfico 19

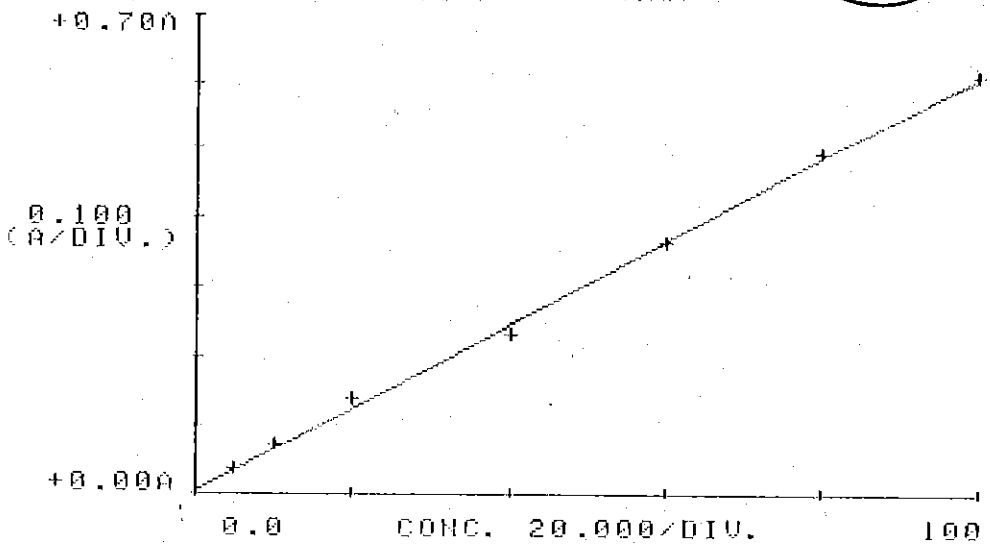


Tabla 7

CONC.	ABS.
0.0000	0.000
5.0000	0.036
10.000	0.072
20.000	0.140
40.000	0.275
60.000	0.366
80.000	0.493
100.00	0.610

Gráfico 20

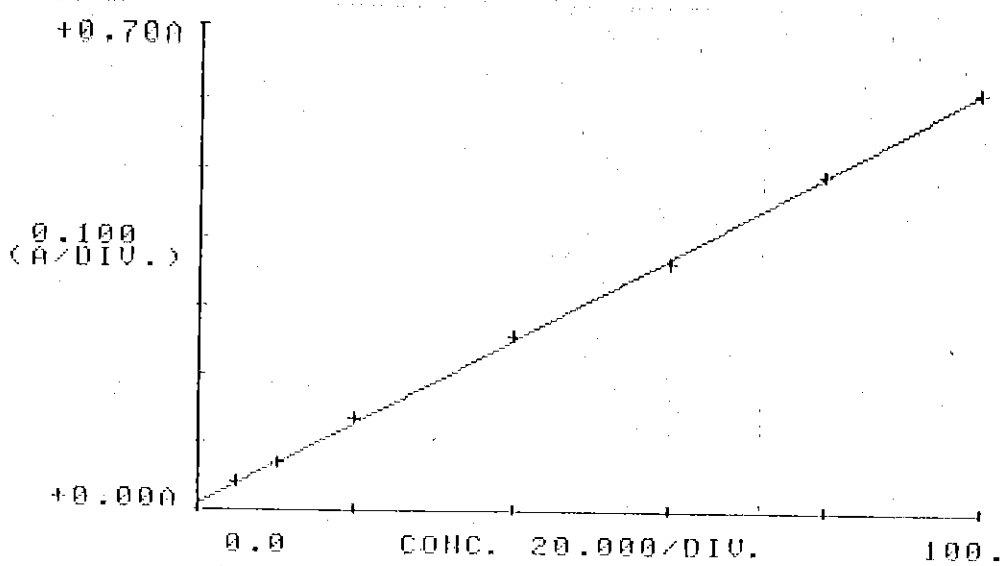


Tabla 8

CONC.	ABS.
0.0000	0.000
5.0000	0.040
10.000	0.070
20.000	0.135
40.000	0.255
60.000	0.355
80.000	0.492
100.00	0.614

CURVAS DE TRABAJO DE RIFAMPICINA

Gráfico 21

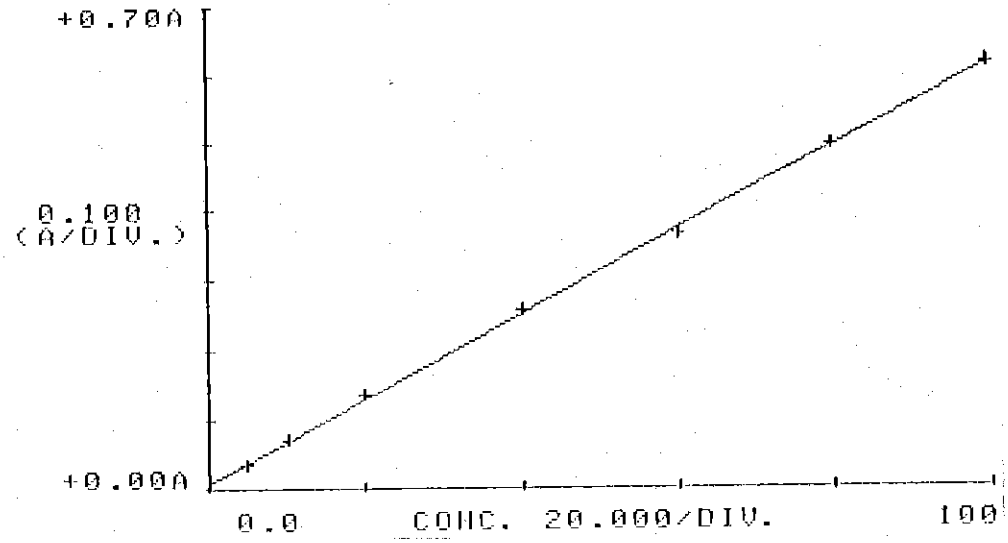


Tabla 9

CONC.	ABS.
0.0000	0.000
5.0000	0.035
10.000	0.073
20.000	0.136
40.000	0.258
60.000	0.366
80.000	0.495
100.00	0.615

Gráfico 22

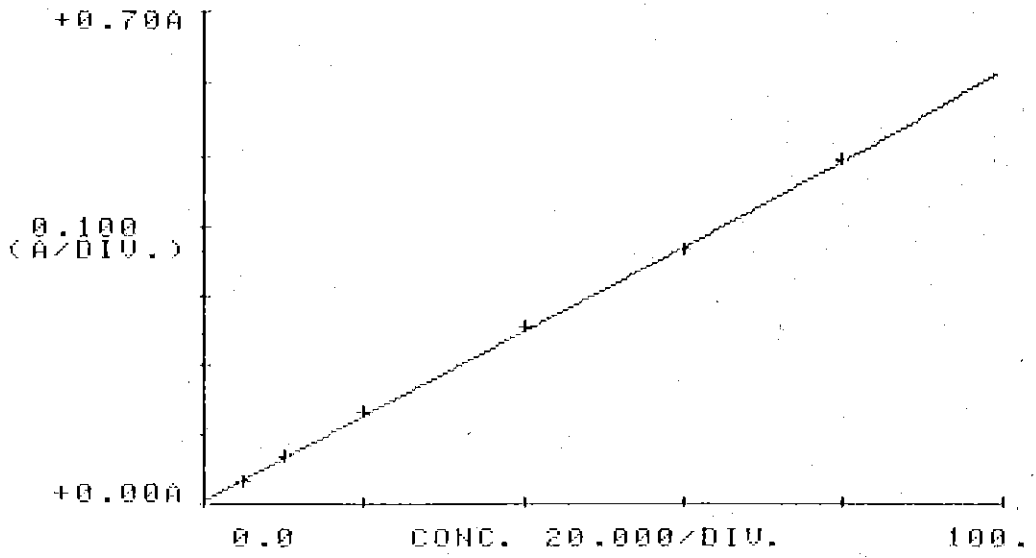


Tabla 10

CONC.	ABS.
0.0000	0.000
5.0000	0.032
10.000	0.070
20.000	0.132
40.000	0.255
60.000	0.370
80.000	0.499
100.00	0.612

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

CURVAS DE TRABAJO DE RIFAMPICINA

Gráfico 23

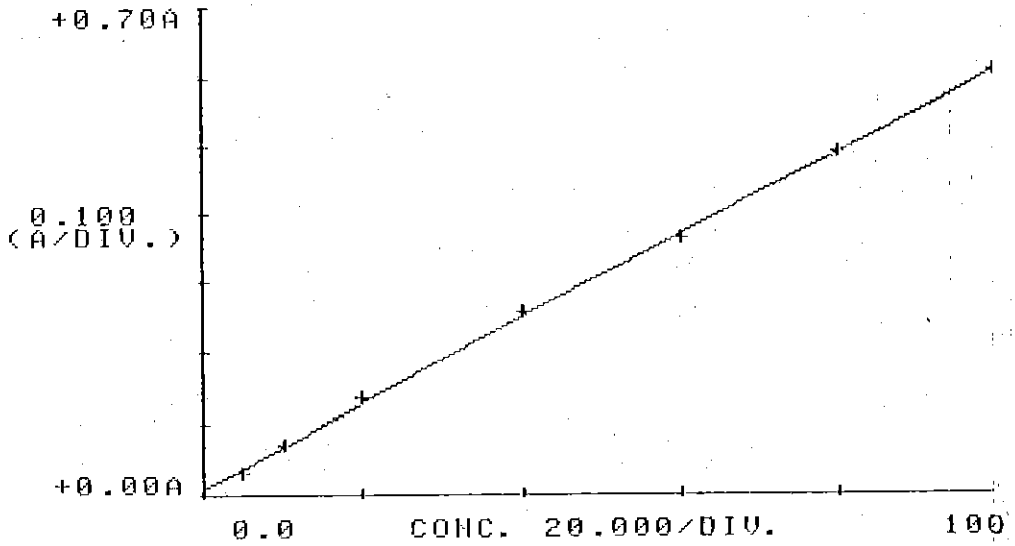


Tabla 11

CONC.	ABS.
0.0000	0.000
5.0000	0.031
10.000	0.074
20.000	0.137
40.000	0.256
60.000	0.363
80.000	0.493
100.00	0.612

Gráfico 24

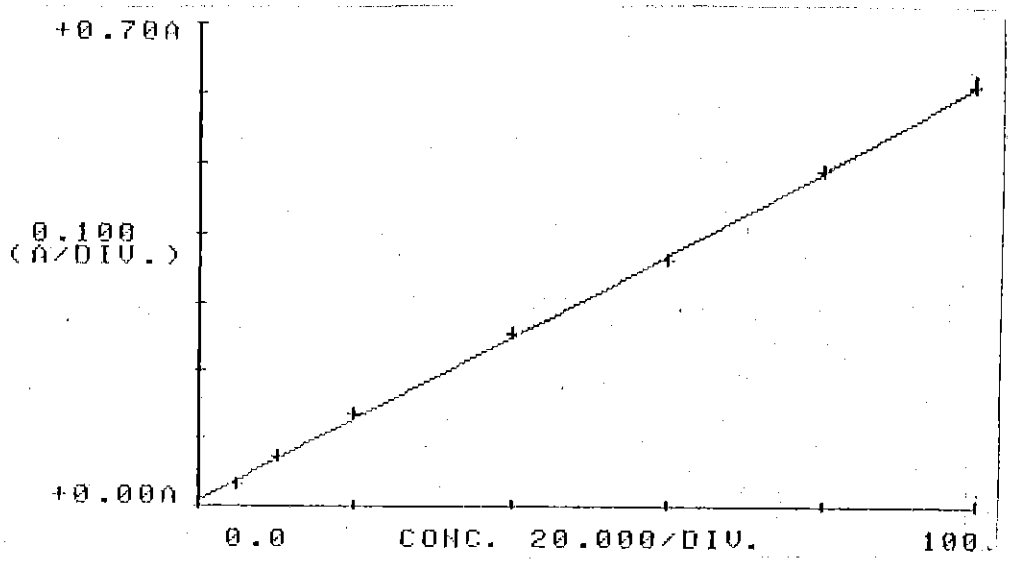


Tabla 12

CONC.	ABS.
0.0000	0.000
5.0000	0.034
10.000	0.073
20.000	0.136
40.000	0.257
60.000	0.364
80.000	0.490
100.00	0.613

CURVAS DE TRABAJO DE RIFAMPICINA

Gráfico 25

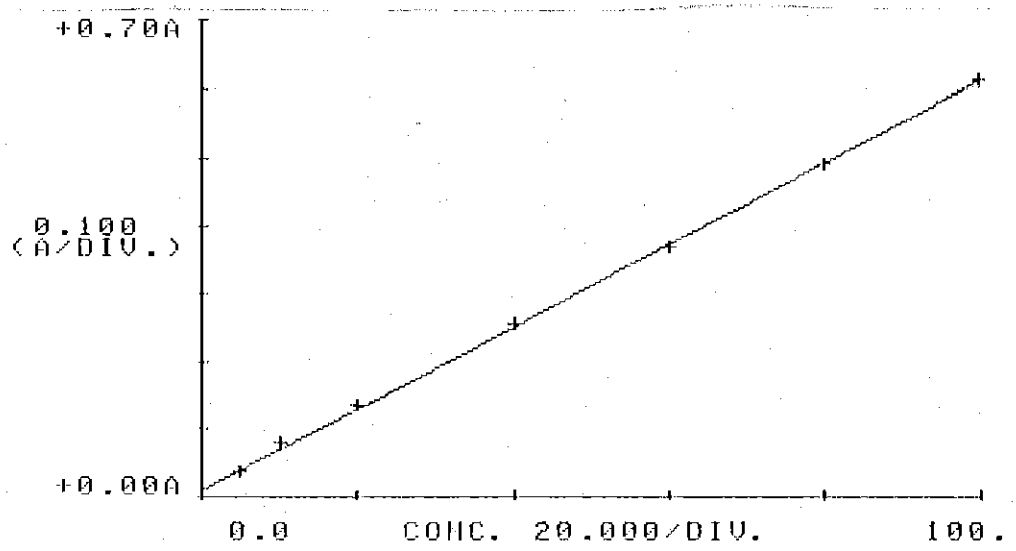


Tabla 13

CONC.	ABS.
0.0000	0.000
5.0000	0.036
10.000	0.080
20.000	0.137
40.000	0.255
60.000	0.368
80.000	0.490
100.00	0.618

Gráfico 26

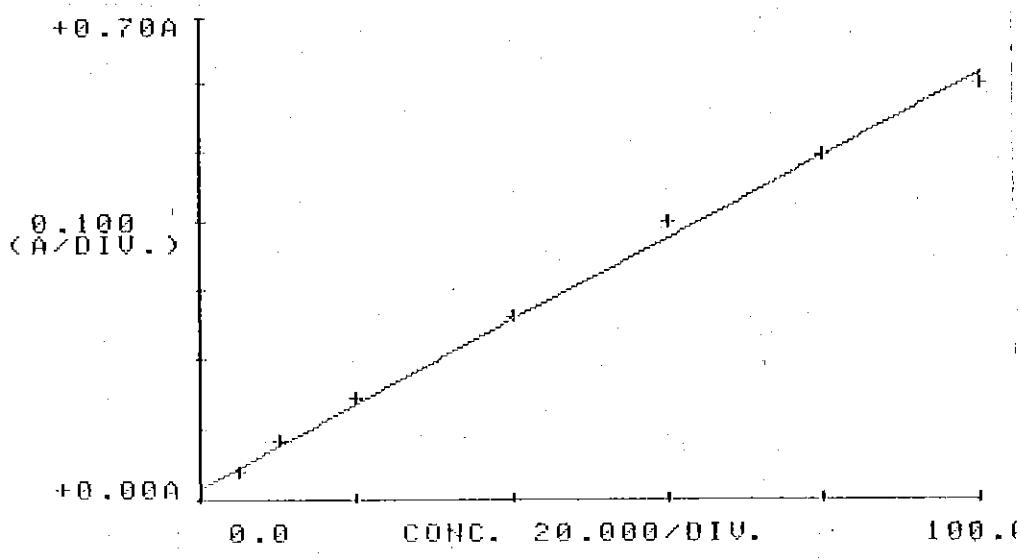


Tabla 14

CONC.	ABS.
0.0000	0.000
5.0000	0.039
10.000	0.085
20.000	0.145
40.000	0.260
60.000	0.400
80.000	0.495
100.00	0.600

Tabla 15

TABLA DE DATOS DE NIÑOS QUE INGIEREN DIARIAMENTE UNA DOSIS DE RIFAMPICINA DE 10 mg/kg DE PESO

EDAD (años)	PESO (Kg)	SEXO	Vol O. (ml)	TIEMPO Tto (dias)	DOSIS (mg/Kg)	CANT. INGERIDA (mg)	CONC. 24 HORAS (mg)	CONC/ PESO	ug/ml
13	48	0	850	15	10	480	45.784	0.953833333	53.86352941
12	45	0	1000	20	10	450	45.74	1.016444444	45.74
14	52	1	1050	10	10	520	54.68	1.051538462	52.07619048
14	44	1	890	24	10	440	51.283	1.165522727	57.62134831
12	45	0	800	14	10	450	42.374	0.941644444	52.9675
13	45	0	1450	40	10	450	32.787	0.7286	22.61172414
14	46	1	980	14	10	460	55.908	1.215391304	57.04897959
13	51	0	890	13	10	510	48.529	0.95154902	54.52696629
5	18	1	840	10	10	180	13.476	0.748666667	16.04285714
2	20	1	586	50	10	200	16.2312	0.81156	27.69829352
5	16	1	800	8	10	160	12.599	0.7874375	15.74875
6	18	0	820	5	10	180	11.038	0.613222222	13.46097561

Leyenda

varón =	1,	ug/ml =	microgramos por mililitro,	Kg =	Kilogramos,	CANT. =	Cantidad	
mujer =	0,	Vol =	Volumen,	Tto =	Tratamiento,	CONC. =	Concentración	
ml =	mililitros,	mg/kg =	miligramos por kilogramo,	mg =	miligramos,	CONC/PESO =	Concentración	por peso
O. =	orina							

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA FARMACIA Y BIOQUIMICA

Gráfico 27

DATOS Y CURVA ESTÁNDAR PROMEDIO

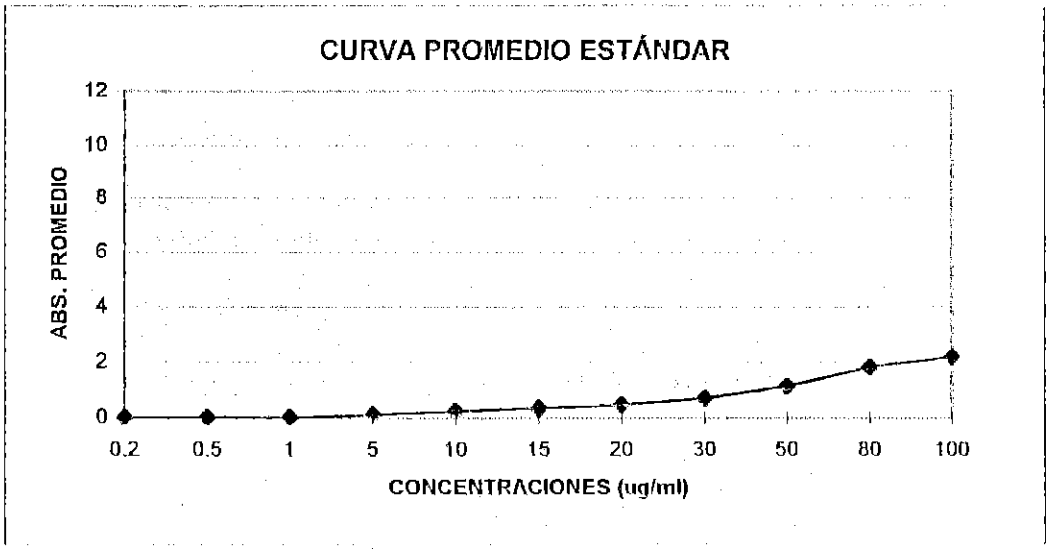


Tabla 16

CONCENTRACIONES (ug/ml)	ABS. PROMEDIO
0.2	0.011666667
0.5	0.019
1	0.029666667
5	0.121666667
10	0.230666667
15	0.341333333
20	0.456333333
30	0.669
50	1.106666667
80	1.801
100	2.178

Leyenda
ug/ml = microgramos por mililitro
ABS = Absorbancia

Gráfico 28

DATOS Y CURVA DE TRABAJO PROMEDIO

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

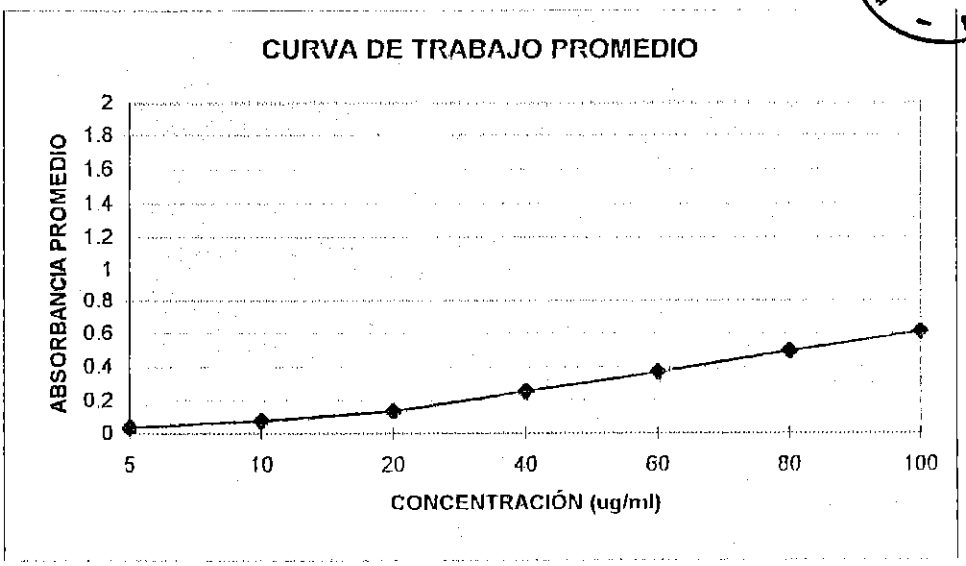


Tabla 17

CONCENTRACIÓN (ug/ml)	ABS. PROMEDIO
0	0
5	0.035375
10	0.074625
20	0.13725
40	0.25375
60	0.369625
80	0.493
100	0.61175

Leyenda

ug/ml =	microgramos por mililitro
ABS. =	Absorbancia

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Tabla 18

DATOS ESTADÍSTICOS HALLADOS DE LAS CURVAS ESTÁNDAR Y DE TRABAJO

	CURVA ESTÁNDAR	CURVA DE TRABAJO
Tamaño de la muestra (n)	11	7
Coeficiente de correlación (r)	0.9998	0.99975
Nivel de significancia (p)	< 0.001	< 0.001

Tabla 19

COMPARACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE DATOS ANTERIORMENTE PUBLICADOS Y NUESTROS RESULTADOS

	Datos de Joseph George (2)	Nuestros Datos
n	15	12
Concentración promedio (ug/ml)	38.77	39.1172595
Error estándar	10.65	5.26715727

test de student = 0.027957648
$p < 0.001$

Leyenda
n = tamaño de la muestra
p = nivel de significancia
ug/ml = microgramos por mililitro

Tabla 20

VALORES MEDIOS Y DE DISPERSIÓN DE DATOS DE NIÑOS QUE INGIEREN UNA DOSIS ORAL DIARIA DE 10 mg/kg DE PESO DE RIFAMPICINA (referencia tabla 15)

Grupo de 12-14 años (n = 8)

	EDAD	PESO	VOL ORINA (ml)	TIEMPO Tto.(días)	CANT. ING.	CONC.O.24 horas
Media	13.13	47	988.75	18.75	470	47.14
Desviación Estándar	0.83	3.02	203.92	9.63	30.24	7.42
Error Estándar	0.3	1.07	72.1	3.41	10.69	2.62
CV%	6.36	6.43	20.62	51.37	6.43	15.74

Grupo de 2 - 6 años (n = 4)

Media	4.5	18	761.5	18.25	180	13.34
Desviación Estándar	1.73	1.63	118.13	21.27	16.33	2.18
Error Estándar	0.87	0.82	59.07	10.63	8.16	1.09
CV%	38.49	9.07	15.51	116.53	9.07	16.33

Leyenda
CV% = Covarianza porcentual
VOL.= Volumen
Tto. = Tratamiento
CANT.ING.= Cantidad ingerida
CONC.O.= Concentración en Orina
n = tamaño de muestra

TABLA 21

TABLA DE COMPARACIÓN DE DOSIS ADMINISTRADA Y CONCENTRACIÓN ALCANZADA EN NUESTRO ESTUDIO Y EN LA LITERATURA

dosis diaria promedio de nuestro estudio	concentración hallada en orina en nuestro estudio	dosis diaria de literatura	concentración de literatura (en orina)
373.33 mg	39.1125 ug/ml	600 mg (2)	29.74 ug/ml (2)
373.33 mg	35.8691 mg en 24 horas	450 mg (1)	67.5 mg en 24 horas (1)

Leyenda
mg = miligramos
ug/ml = microgramos por mililitro

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

V.- DISCUSIÓN

Se ha evaluado la Rifampicina en orina de niños con tuberculosis que ingieren una dosis oral de Rifampicina a través de un método modificado de cuantificación a partir aplicado por Sunahara y Nakagawa (1).

Los niveles de Rifampicina y sus metabolitos en líquidos biológicos han sido determinados tanto por técnica espectrofotométricas, como por técnicas microbiológicas siendo a la vez comparadas (1, 2). La metodología de este trabajo se basó en las investigaciones realizadas por Sunahara y Nakagawa, y comprendió un análisis químico preliminar de la Rifampicina, para conocer de esta manera su comportamiento en la orina; y luego con la ayuda de estos datos modificar el método original y así lograr resultados positivos en la determinación cuantitativa de la Rifampicina en orina.

En un primer momento la evaluación de la Rifampicina comprendía también sangre y Líquido Cefalorraquídeo de niños tuberculosos del Servicio de Neuropediatría del Instituto Nacional de Salud del Niño; pero para lograr esto necesitábamos de una metodología para cuantificar los niveles en estos fluidos. Ensayamos la modificación del método. Lamentablemente esto no se pudo lograr, tal vez debido a que el desproteinizado de la muestra no se llevó a cabo adecuadamente. La literatura recomienda la utilización de tubos que contienen en sus paredes internas hidrogeles y que se comercializan listos para ser utilizados. Al añadir el reactivo para desproteinizar el fármaco a analizar puede sufrir cambios (32). También cabe la posibilidad que el método modificado no sea tan sensible como el

método original, como se hace referencia en una comparación realizada entre el método espectrofotométrico original y un método biológico (2).

Inicialmente se analizó el comportamiento de la Rifampicina estándar en los diferentes solventes con que se contaba para poder lograr una adecuada extracción. La tabla 1 muestra los diferentes solventes en los cuales fue ensayada la droga, se observó que tanto en el alcohol isoamílico, como en el cloroformo se obtuvieron extracciones adecuadas para nuestro propósito. Las razones que nos llevaron a la elección del cloroformo en vez del alcohol isoamílico como recomienda el método original (1) fueron las ventajas de accesibilidad y manipulación que ofrecía el cloroformo.

Luego se procedió a analizar el comportamiento de la Rifampicina en cloroformo. La molécula de Rifampicina se disuelve muy bien en este solvente (31, 32), pero al analizar la curva espectral de la Rifampicina y sus metabolitos en este solvente a través del espectrofotómetro encontramos que no se ajustaba a los patrones requeridos. Los resultados obtenidos pueden observarse en los gráficos 1, 2 y 3.

Se determinó el sistema de solventes para la Rifampicina y sus metabolitos, los resultados se presentan en la tabla 2. La literatura recomienda el medio metanol : cloroformo (3:17)(42), se obtuvieron los mejores resultados con este medio. En el cromatograma 1 puede observarse la Rifampicina comparada con un estándar de la misma droga revelada con el reactivo de vainillina y en el cromatograma 2 con reactivo de Vuck. Podemos observar que las muestras presentan una velocidad de

desplazamiento (Rf) parecido al Rf del estándar (Rf de la muestra menor que Rf estándar en el cromatograma 1) y con Rf a la misma altura (Cromatograma 2). Además pudo observarse otros metabolitos de Rifampicina cuyas manchas lamentablemente no son visibles excepto en el cromatograma 2.

Luego se analizó la curva espectral de la orina blanco (Gráficos 13 y 14). También se realizó un análisis del metanol (gráfico 15) a la longitud de onda de análisis para Rifampicina. Estos resultados corroboran los obtenidos al realizar la curva espectral de absorción de Rifampicina comparada con orina blanco (gráficos 11 y 12) demostrando con esto la inexistencia de una posible interferencia en la cuantificación de la Rifampicina.

Paralelamente a estas determinaciones se realizó la determinación del pH óptimo de extracción de la Rifampicina y sus metabolitos. Los resultados aparecen en la tabla 3. Según Sunahara y Nakagawa (1), el pH óptimo de extracción es de 7.

En la literatura se hace referencia al uso de soluciones tampones para el análisis de drogas, inclusive Sunahara y Nakagawa (1) hace esta referencia. Lo que se buscó en todo momento es obtener un método rápido y simple para la determinación de las concentraciones de Rifampicina en orina.

Debido a que la Rifampicina disuelta en cloroformo no cumplía con la Ley de Lambert y Beer tuvo que evaporarse el cloroformo y probar otro solvente en el cual la Rifampicina si cumpla la misma para poder ser cuantificable. La literatura (31, 32) cita al metanol como solvente adecuado para la Rifampicina. Para esto analizamos la curva espectral de Rifampicina y sus metabolitos en metanol utilizando como blanco

el mismo solvente a través del espectrofotómetro. Los resultados se muestran en los gráficos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

Con estos resultados se procedió a realizar la curva estándar (gráficos 16, 17 y 18 y tablas 4, 5 y 6 respectivamente). La curva estándar promedio se calculó a partir de estas curvas estándar (gráfico 27, tabla 16). Luego procedimos a realizar nuestra curva de trabajo, los datos obtenidos se presentan en los gráficos 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 con sus respectivas tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14. A partir de los datos de las curvas de trabajo elaboradas se calculó la curva de trabajo promedio (gráfico 28 y tabla 17). Sunahara y Nakagawa (1) realizaron curvas de calibración para cuantificar los niveles de Rifampicina en líquidos biológicos, pero no explican como realizaron estas curvas.

Para analizar los datos de las curvas estándar promedio y la curva de trabajo promedio se presenta la tabla 18 en la que encontramos un coeficiente de correlación de Pearson para la curva estándar promedio $r = 0,9998$ y para la curva de trabajo promedio $r = 0,99975$ por lo tanto aceptamos que hay una relación directa altamente significativa que demuestra que los datos de la curva de trabajo promedio pueden considerarse como pertenecientes a una curva estándar.

Los resultados de las concentraciones de Rifampicina en orina de niños con tuberculosis, a quienes se les administró una dosis diaria de la droga, de la misma especialidad farmacéutica; se muestra en la tabla 15. En esta tabla puede observarse la concentración de Rifampicina expresada en miligramos (mg.) en orina de 24 horas. También puede observarse las concentraciones de Rifampicina expresadas en

microgramos por mililitro (ug/ml), además de la relación entre la concentración de Rifampicina (miligramos en 24 horas) sobre peso corporal (kilogramos).

En los datos obtenidos por Sunahara y Nakagawa (1) podemos encontrar concentraciones de Rifampicina expresadas en miligramos (mg.)en orina de 24 horas cuyos valores se encuentran entre 35 y 100 mg para 13 personas (valor promedio 67,5 miligramos de Rifampicina, tabla 21), con una dosis diaria de 450 mg de Rifampicina ingerida antes del desayuno. Nuestro valor promedio hallado fue de 35,8691 miligramos de Rifampicina en orina de 24 horas, con una dosis diaria promedio de 373,33 miligramos (Tabla 21).

En los datos obtenidos por Joseph George (2) se obtuvieron concentraciones de Rifampicina expresadas en microgramos por mililitro (ug/ml.) de orina de 24 horas de 15 pacientes cuyos promedios fueron de 38.77, 28.73 y 21.72 (valor promedio 29,74 tabla 21) con una dosis diaria de 600 miligramos de Rifampicina. Nuestro valor promedio hallado fue de 39,1125 ug/ml con una dosis diaria promedio de 373,33 miligramos (Tabla 21).

Nuestros pacientes ingirieron una dosis diaria que va de 160 a 520 mg de Rifampicina, a pesar que las dosis son menores que las utilizadas diariamente por Joseph George (600 mg) nuestro valor promedio excretado (en ug/ml) es mayor que el valor promedio obtenido por este autor. En cambio comparando nuestro valor promedio (35,8691 miligramos de Rifampicina excretada en orina de 24 horas) con el promedio hallado por Sunahara y Nakagawa (67,5 miligramos en orina de 24

horas) el nuestro resulta menor pero nuestra dosis promedio es menor (estos datos pueden observarse en la tabla 21)

Esto tal vez se deba a la mayor ingesta de líquidos por los niños lo cual produciría mayor eliminación de Rifampicina a nivel renal . Además el metabolismo del niño es mayor que el del adulto en condiciones normales lo que traería como consecuencia un metabolismo más rápido de la Rifampicina en estas personas. En los casos en que se presentan lesiones hepáticas, el metabolismo de Rifampicina se alteraría produciéndose un metabolismo más lento en los niños, tal vez en estas situaciones se asemejaría al metabolismo en adultos.

Cabe resaltar una vez más que nuestra dosis promedio ingerida por nuestros niños tuberculosos pacientes del Servicio de Neuropediatría del INSN es menor comparada con las dosis ingeridas tanto en el estudio realizado por Sunahara y Nakagawa como en el realizado por Joseph George, Bathia y Balakrishnan lo que demostraría un metabolismo más acelerado que seguramente debe reflejarse en menores valores plasmáticos alcanzados.

Además se analizaron estos datos con los nuestros aplicando la test de Student para concentraciones en microgramos por mililitro (ug/ml) , test de student = 0,027957648, $p < 0,001$ sin significancia estadística (tabla 19).

Los datos de niños que ingieren dosis diaria Rifampicina pueden agruparse de acuerdo a la edad (tabla 20):

a) de 2 a 6 años, con Coeficiente de Varianza Porcentual (CV%) = 15,74%

b) de 12 a 14 años, con CV% = 16,33%

los cuales en el caso de CV > 25% podría indicar baja precisión de las observaciones, factores erráticos que no pueden controlarse, o errores de diseño experimental, o heterogeneidad de las unidades muestrales, como sucede cuando el muestreo es del tipo de conveniencia, en que las unidades entran en la muestra según se presenten y en condiciones especiales. En nuestro estudio no sucede esto por lo que podría decirse que los datos obtenidos no presentan elevada variabilidad cuando se los agrupa por edades.

Los análisis de las muestras de orina se realizaron inmediatamente después de recibidas, ya que la literatura consultada recomienda almacenarlas en refrigeración sólo por 24 horas (43).

VI.- CONCLUSIONES

1.- Mediante el método modificado de Sunahara y Nakagawa se evaluó la Rifampicina y sus metabolitos, en 12 muestras de orina de niños tuberculosos de nuestro país pacientes del Servicio de Neuropediatría del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN); concluyéndose que las dosis de Rifampicina administradas cumplen con la terapia para el tratamiento de la tuberculosis (TBC), lo que se comprueba con los valores de Rifampicina obtenidos en el análisis de orina.

2.- En el análisis de orina de niños tuberculosos, que ingirieron dosis diaria de 10 miligramos de Rifampicina por kilogramo de peso (mg/Kg) cada 24 horas, en promedio 373,33 miligramos (mg) durante los primeros 30 días; manifestaron un metabolismo incrementado de la Rifampicina con una eliminación promedio de 39,1125 microgramos por mililitro (ug/ml); lo que contrasta con las cantidades administradas en adultos en dosis diaria de 600 mg en la India, en cambio; estos mismos valores concuerdan con el trabajo de investigación realizado en Japón, en el cual la dosis diaria administrada fue de 450 miligramos.

3.- Con la evaluación de los estudios preliminares se demuestra que no existen mayores interferencias que hayan alterado la cuantificación espectrofotométrica de Rifampicina y sus metabolitos en las muestras analizadas.

VII.- RECOMENDACIONES

1.- Se recomienda continuar con los estudios de los parámetros farmacocinéticos de Rifampicina y sus metabolitos utilizando éste método modificado.

2.- Se recomienda realizar estudios para evaluar el cumplimiento terapéutico del tratamiento de la tuberculosis utilizando éste método modificado con pacientes adultos hospitalizados y ambulatorios.

3.- Mediante el empleo de capa fina identificar y verificar los metabolitos de Rifampicina que poseen acción terapéutica.

4.- Debe tratar de adaptarse el método modificado para cuantificar Rifampicina en líquido cefalorraquídeo y sangre.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.- Sunahara S, Nakagawa H. Metabolic study and controlled clinical trial of Rifampin. *Chest.* 1972. 61: 6: 526-532.

2.- Joseph G, Bhatia V, Balakrishnan S. Microbiological assay versus spectrophotometry for determination of Rifampicin in urine. Indian Journal of Leprosy. 1988. Vol 60. N° 1. 47-51

3.- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). *Perú: Características de Salud de la población 1985-1995.* Primera edición, Editorial INEI (Encuesta Nacional de Hogares 1995); Diciembre 1996; Lima, p. 428.

4.- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), Ministerio de Salud (MINSA). *Compendio de Estadísticas Sociales 1995-1997.* Primera edición,Editorial Dirección técnica de Demografía y Estudios Sociales. Octubre 1997. Lima, p. 201

5.- Armijo J, De Cos M. Farmacología Clínica: Objetivos y Metodología. En: Florez J, Armijo J, Mediavilla A. *Farmacología Humana.* 2ª Edición. Barcelona. Ediciones Científicas y Técnicas. 1992.160-168.

6.- Wolfgang S, Geertruida C. *Drug Level Monitoring.* USA. Edited by John Wilcy and Sons. 1980.

7.- Schumann B. Análisis de orina. En: Kaplan L, Pesce A. *Química Clínica. Técnicas de laboratorio.* Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1986. 1178-1183.

8.- Tosceland P. Samples and Sampling. En The Pharmaceutical Society of Great Britain. *Clarke's isolation and identification of drugs*. Second Edition. London. London The Pharmaceutical Press. 1986. 111-117.

9.- Rossi G. Pruebas Biológicas. En Gennaro A. *Remington Farmacia*. 17ª Edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1987.749-760.

10.- Gerson B. *Essentials of therapeutic drug monitoring*. First Edición. New York. Editorial Igaku-Shoin. 1983. 285-297.

11.- Abdou H. Métodos de análisis de tipo instrumental. En Gennaro A. *Remington Farmacia*. 17ª Edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1987.846-891

12.- Galen E. *Métodos Instrumentales de Análisis Químico*. Mexico, Mc Graw Hill. 1978.

13.- Fell A. Ultraviolet, Visible, and Fluorescence Spectrophotometry . En The Pharmaceutical Society of Great Britain. *Clarke's isolation and identification of drugs*. Second Edition. London. London The Pharmaceutical Press. 1986. 221-236.

14.- Grafton C. Aplicaciones médicas de los radioisótopos. En Gennaro A. *Remington Farmacia*. 17ª Edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1987.639-676.

15.- Randerath K. *Cromatografía de Capa Fina*. Segunda Edición. Bilbao. Ediciones Urmo. 1970. 6-15.

16.- Marks V. Therapeutic Drug Monitoring. En The Pharmaceutical Society of Great Britain. *Clarke's isolation and identification of drugs*. Second Edition. London. London The Pharmaceutical Press. 1986. 101-110.

17.- Bailey L. Cromatografía. En Gennaro A. *Remington Farmacia*. 17ª Edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1987. 809-845.

18.- Bowman W, Rand M. *Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas*. Mexico. Nueva Editorial Interamericana. 1984.

19.- Peloquin C. Therapeutic drug monitoring of the antimycobacterial drugs. En: *Clinics in Laboratory Medicine- Clinical Mycobacteriology*. WB Saunders Company. 1996. Vol 16 N°3. 717-729.

20.- Stewart C. Absorción, acción y distribución de las drogas. En Gennaro A. *Remington Farmacia*. 17ª Edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1987. 980-1017.

21.- Sippel J, Isis M, Girgis N, Youssef H. Rifampin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. *Am. Rev. of Resp. Dis*. 1974. 109: 579-580.

22.- D'oliveira J. Cerebrospinal fluid concentrations of rifampin in meningeal tuberculosis. *Am. Rev. of Resp. Dis*. 1972. 106: 432-437.

23.- Capelle P, Dhimeaux D, Mora M, Feldmann G, Berthelot P. Effect of rifampicin on liver function in man. *Gut*. 1972. 13: 366-371.

24.- Davidson P, Goble M, and Lester W. The Antituberculosis Efficacy of Rifampin in 136 patients. *Chest*. 1972. 61: 574-578.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

25.- Hobby G. Summation of experimental studies on the action of rifampin. *Chest.* 1972. 61: 550-554.

26.- Mandell G, Sande M. Agentes antimicrobianos. En Goodman L, Gilman A. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* Sétima Edición. Editorial Médica Panamericana. 1990. Buenos Aires. p. 1179 - 1182.

27.- Verbist L, Gyselen A. Antituberculous activity of Rifampin in vitro and in vivo and the concentrations attained in human blood. *Am. Rev. of Resp. Dis.* 1968. 98: 923-932.

28.- Hobby G, Lenert T. The action of Rifampin alone and in combination with other antituberculous drugs. *Am. Rev. of Resp. Dis.* 1970. 102: 462-465.

29.- Zinner S, Husson M, Klastersky J. Effect of mixing on rifampin bactericidal activity against Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1981. 20: 267-269.

30.- Hobby G, Lenert T. Observations on the action of rifampin and ethambutol alone and in combination with other antituberculous drugs. *Am. Rev. of Resp. Dis.* 1972. 105: 292-295.

31.- Merck Sharp and Co. Inc. *Merck Index.* Décimo primera Edición. New Jersey. 1989. 1068.

32.- Analytical and toxicological data: monographs. En The Pharmaceutical Society of Great Britain. *Clarke's isolation and identification of drugs.* Second Edition. London. London The Pharmaceutical Press. 1986. 960.

33.- Palmer K, Petrie J. Enfermedades Respiratorias. En Avery G. *Farmacología clínica y terapéutica*. Segunda Edición. Barcelona. Salvat Editores. 1983. 727.

34.- Kiyoshi K, Kotaro O, Fumio A, Junji Y, Sutemi O. Mode of action of rifampin on Mycobacteria I. *Am. Review of Resp. Dis.* 1973. 107: 1002-1005.

35.- Kiyoshi K, .Kotaro O, Sutemi O. Mode of action of rifampin on Mycobacteria II. *Am. Review of Resp. Dis.* 1973. 107: 1006-1012.

36.- Acocella G, Angel J. Short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis: A new aproach to drug dosage in the initial intensive phase. *Am. Rev. of Respir.* Dis. 1986. 134: 6: 1283-1286.

37.- Snider D, Graczyk J, Bek E, Rogowski J. Supervised six months treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis using isoniazid, rifampin and pyrazinamide and with and without streptomycin. *Am. Rev. of Respir. Dis.* 1984. 130: 6: 1091-1094.

38.- Tanzania/British Medical Research Council Study. Controlled clinic trial of two-6-month regimens of chemotherapy in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. of Respir. Dis.* 1985. 131: 5: 727-731.

39.- Dutt A, Moers D, Stead W. Smear and culture-negative pulmonary tuberculosis: Four month short-course chemotherapy. *Am. Rev. of Respir. Dis.* 1989. 139: 4: 867-870.

40.- Ellard G, Ellard D, Allen B, Girling D, Nunn A, Seng-kee T, et al. The bioavailability of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in two commercially

available combined formulations designed for use in the short-course treatment of tuberculosis. *Am. Rev. of Resp Dis.* 1986. 133: 6: 1076-1080.

41.- Agounitestane D, Chiheb M, Khaled S, Khaled N, Boulahbal F, Chaulet P. Essai thérapeutique d'une combinaison de trois médicaments essentiels dans la chimithérapie courte de la tuberculose. *Rev. Mal. Resp.* 1990. 7: 209-213.

42.- Consejo de Europa. *Farmacopea Europea.* Segunda Edición. Madrid. 1988. Vol 1. 52-2.

43.- Burkhardt K, Nel E. Monitoring regularity of drug intake in tuberculous patients by means of simple urine tests. *S. Afr. Med. J.* 1980. 57 (24): 981-985.

U. N. M. S. M.
BIBLIOTECA DE FARMACIA
Y BIOQUIMICA
Jr. Puno 1002 - Apart. 1760
Lima 1 - Perú