

302827

**UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.**

Escuela de Química  
Con Estudios Incorporados a la U. N. A. M.

8  
2ej



**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA  
CUANTIFICACIÓN DE PIRAZINAMIDA**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
**P R E S E N T A**  
MR. DE LOS ANGELES RAQUEL MORENO GARRADOS

MEXICO. D. F.

1992



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# INDICE

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Capítulo 1 | INTRODUCCION .....  | 1  |
| 1.1        | Planearamiento del Problema .....                                       | 1  |
| 1.2        | Objetivos .....   | 2  |
| 1.3        | Hipótesis .....   | 3  |
| Capítulo 2 | ANTECEDENTES .....  | 4  |
| 2.1        | Monografía de la Pirazínamida (PZA) .....                               | 4  |
| 2.2        | Farmacología .....  | 5  |
| 2.2.1      | Antecedentes Históricos .....   | 5  |
| 2.2.2      | Mecanismo de Acción .....   | 6  |
| 2.2.3      | Usos Terapéuticos .....   | 6  |
| 2.2.4      | Niveles Terapéuticos y Dosis .....                                      | 6  |
| 2.2.5      | Reacciones Adversas .....   | 7  |
| 2.2.6      | Precauciones .....  | 8  |
| 2.2.7      | Toxicidad .....   | 9  |
| 2.2.8      | Interacciones con Antifímicos .....                                     | 9  |
| 2.3        | Aspectos Farmacocinéticos .....   | 10 |
| 2.3.1      | Vías de Administración .....  | 10 |
| 2.3.2      | Absorción .....   | 10 |
| 2.3.3      | Metabolismo .....   | 11 |
| 2.3.4      | Eliminación .....   | 11 |
| 2.4        | Prueba de Disolución .....  | 14 |
| 2.5        | Características Fundamentales que debe reunir un método analítico ..... | 14 |
| 2.5.1      | Linealidad .....  | 15 |
| 2.5.2      | Límite de Detección .....   | 15 |

|                   |  |           |
|-------------------|--|-----------|
| 2.5.3             | Precisión y Exactitud .....                                    | 15        |
| 2.5.4             | Especificidad .....  | 16        |
| 2.5.5             | Especificidad en Estabilidad .....                             | 16        |
| 2.5.6             | Tolerancia del Sistema .....                                   | 17        |
| 2.5.7             | Estabilidad de la Muestra .....                                | 17        |
| <b>Capítulo 3</b> | <b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>                                | <b>18</b> |
| 3.1               | Diagrama de Flujo .....  | 19        |
| 3.2               | Material, equipo y reactivos .....                             | 19        |
| 3.2.1             | Material Biológico .....                                       | 19        |
| 3.2.2             | Material de Laboratorio .....                                  | 19        |
| 3.2.3             | Equipo de Laboratorio .....                                    | 19        |
| 3.2.4             | Reactivos .....  | 20        |
| 3.2.4.1           | Preparación de Reactivos .....                                 | 20        |
| 3.3               | Metodología .....  | 21        |
| 3.3.1             | Curvas Patrón .....  | 21        |
| 3.3.2             | Validación de los Métodos .....                                | 24        |
| 3.4               | Procesamiento de la Muestra (Método Espectrofotométrico) ..... | 25        |
| 3.5               | Procesamiento de la Muestra (Método Cromatográfico) .....      | 26        |
| 3.5.1             | Condiciones Cromatográficas .....                              | 26        |
| <b>Capítulo 4</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>                          | <b>27</b> |
| 4.1               | Resultados .....   | 27        |
| 4.2               | Discusión .....  | 52        |
| <b>Capítulo 5</b> | <b>CONCLUSIONES .....</b>                                      | <b>57</b> |



## 1.1 Planteamiento del Problema.

La Pirazinamida (PZA) es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar, recientemente ha sido agregada al esquema tradicional de tratamiento en los casos de Meningitis Tuberculosa (20).

Aunque las asociaciones de antituberculosos se han estudiado en diferentes partes del mundo, la toxicidad elevada que muestran hacen necesario determinar la terapia más eficaz y menos riesgosa, por ello se considera necesario que debe establecerse un estudio riguroso de los niveles en fluidos biológicos lo cual permitirá complementar y establecer criterios de decisión junto con las observaciones clínicas. Existen reportes en la literatura que indican que la administración de la PZA a una dosis corregida por el peso corporal produce concentraciones séricas que varían mucho de un individuo a otro, aparentemente por la capacidad de absorción muy específica en cada individuo. (6).

Así mismo, se ha demostrado que las concentraciones séricas de PZA difieren según se administre sola o asociada con otros fármacos, lo cual ha sido explicado mediante una modificación en la absorción intestinal de la PZA. (1).

En México, la tuberculosis es considerada como una enfermedad de salud pública, debido a la escasez de servicios sanitarioasistenciales y bajos niveles generales de vida, lo cual no permite que exista una erradicación del problema aún a pesar de las campañas de medicina preventiva realizadas por las instituciones de salud. (7).

Un alto porcentaje de muertes ocurridas en México en las últimas décadas, es debido a enfermedades infecciosas, la evolución que la tuberculosis ha tenido en nuestro país disminuyó de

16.3 a 8.9 % en diez años y un promedio anual de 4.5 %. (3) En 1982 fallecieron 6524 personas de tuberculosis de las cuales 925 eran menores de 15 años, representando el 1.5 % del total de las defunciones registradas en el país, ocupando la tuberculosis el cuarto lugar en mortalidad. En 1983 representó el 1.5 % del total de muertes y décimo cuarto como causa de defunción, con una tasa de 9.3 por 100 mil habitantes. En ese año, las tasas de defunciones por tuberculosis (por 100 mil habitantes) se debieron a tuberculosis extrapulmonar: aparato respiratorio 8.15 %; meninges y sistema nervioso central 0.44, miliar 0.48; intestinal, genitourinario, de otros órganos y ósea 0.23 % (3)

Las entidades federativas con mayor tasa de mortalidad son: Baja California Norte, Veracruz, Chihuahua, Coahuila y Chiapas. (7)

A partir de 1983 se calcula que en los próximos diez años si no se llevan a cabo los métodos de control de la tuberculosis, 10 a 40 millones de individuos contraerán el padecimiento y decenas a miles fallecerán por meningitis tuberculosa. (7)

Por lo anteriormente expuesto, la vigilancia de los niveles de PZA en fluidos biológicos permitirá complementar y establecer criterios de decisión junto con las observaciones clínicas.

## 1.2 Objetivos.

- Suplementar métodos para la cuantificación de PZA en plasma apropiados a las posibilidades económicas de un hospital.
- Los métodos seleccionados fueron por Espectrofotometría y por Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

### 1.3 Hipótesis.

Los métodos analíticos desarrollados: Espectrofotometría y Cromatografía líquida de alta resolución serán útiles para efectuar estudios de Farmacocinética clínica y de Monitoreo terapéutico en pacientes bajo tratamiento con este fármaco. (H<sub>a</sub>).

Los métodos analíticos desarrollados, anteriormente mencionados no serán útiles para los fines deseados. (H<sub>0</sub>).



## 2.1 Monografía de la Pirazinamida (PZA).

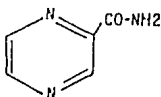
**Nombre genérico :** Pirazinamida.

**Nombres comerciales :** - Braccopiral.

- Eprazin.
- Tebrazid.
- Unlypiranamida.
- Zinamida.

**Fórmula condensada :**  $C_5H_5N_3O$

**Fórmula desarrollada :**



PIRAZINAMIDA

**Peso molecular :** 123.11

**Descripción :** Polvo blanco cristalino, inodoro e insípido.

**Extracción :** La Pirazinamida (PZA) puede extraerse a partir de una solución ácida (pH 4.2) o alcalina con adición de una mezcla de los solventes dietiléter y diclorometano (3:2) (4,6)

**Propiedades Espectrales :** Espectro de Absorción ultravioleta: La PZA presenta su máxima absorción a una longitud de onda de 268 nm.

**Estabilidad :** La Pirazinamida es un fármaco relativamente estable a temperatura ambiente. Se recomienda guardarlo y almacenarlo en recipientes bien cerrados y protegidos de la humedad.

## 2.2 Farmacología.

### 2.2.1. Antecedentes Históricos.

La PZA fué descubierta a principios de la década de los 50 por KUSNER como resultado de la búsqueda de un derivado de la nicotinamida que presentara actividad antituberculosa y que no fuera tóxico. (14)

Se establecieron tres periodos característicos en la historia de la pirazinamida (25).

(1) Estudios Iniciales (1952-1959) con reservas acerca de su uso debido a la toxicidad, ya que reportes sobre la terapia de la PZA en infecciones tuberculosas en animales, mostraron resultados poco alentadores, por lo cual se decide abandonar su uso.

(2) El uso de la PZA como fármaco de segunda elección (1958-1970) en el tratamiento de casos crónicos resistentes a la isoniacida y estreptomicina (1).

(3) El empleo en estudios clínicos en tratamientos de corta duración (1971-1980) (6).

Finalmente, en este último periodo en el que se renueva el interés por la PZA, donde estudios en la clínica indican que la PZA juega un papel relevante en la terapia de corta duración en combinación con Rifampicina e Isoniacida (20).

En la actualidad ha cobrado importancia particularmente en Europa donde las pruebas clínicas han demostrado su utilidad como agente en el tratamiento de esta enfermedad, por lo que ahora es considerada el tercer fármaco más importante en la quimioterapia de la tuberculosis (3).

### 2.2.2. Mecanismo de acción.

Poco se conoce sobre los mecanismos de acción de la PZA. Se ha propuesto la siguiente hipótesis para explicar su actividad antimicrobiana.

La hipótesis más común y evidente, es la que propone que el medio endocelular ácido activa a la pirazinamida. McDermott y col. demostraron que la actividad inhibitoria *in-vitro* se incrementaba considerablemente cuando el pH del medio de cultivo se reducía a pH 5.5. Dado a que el pH que circunda los monocitos es de 4.7, esto podría influir en las concentraciones del ión  $H^+$ , que puede intervenir en factores de ionización de la molécula, modificándola estructuralmente produciendo un metabolito que conserva la actividad de la PZA (16, 18).

### 2.2.3. Usos Terapéuticos.

La pirazinamida se emplea tanto en niños como en adultos, (ya sea sola o combinada con otros fármacos) para el tratamiento de corta duración de la tuberculosis pulmonar. Otras indicaciones incluyen su uso en el tratamiento de Meningitis Tuberculosa y otras afecciones tuberculosas (19).

### 2.2.4. Niveles Terapéuticos y Dosis.

En general el efecto terapéutico se obtiene cuando las concentraciones plasmáticas se encuentran arriba de 45  $\mu\text{g/ml}$ , aunque existen variaciones debidas al sexo, edad, estado de enfermedad, etc. (11).

La pirazinamida penetra rápidamente la barrera hematoencefálica y se obtienen concentraciones de 50 µg/ml. en líquido cefalorraquídeo después de 5 horas de ser administrado el medicamento (3 g.) (23)

Se ha reportado que el Acido Pirazinóico, metabolito de la PZA también es activo y contribuye al efecto terapéutico (25).

Los estudios farmacocinéticos de la pirazinamida son escasos, esta situación hace que los regímenes de dosificación sean inadecuados. Los estudios microbiológicos realizados para establecer dosificaciones a través del parámetro de concentraciones mínimas inhibitorias presentan bajas sensibilidades y no existe ninguna correlación con los resultados obtenidos en la clínica. La PZA es activa a diferentes niveles tisulares, debido a su biotransformación en productos más activos (23).

El esquema posológico aprobado por el Cuadro Básico del Sector Salud es de hasta 7 meses de duración. Administración de una toma al día de acuerdo a lo siguiente :

Fase Intensiva : Administración oral de 2 g. del medicamento de lunes a sábado, durante 3 meses (60 dosis).

Fase de Mantenimiento : Administración del medicamento 2 veces por semana, durante 4 meses (30 dosis) (21).

#### 2.2.5. Reacciones Adversas.

Las reacciones adversas más frecuentes son :

**Hepatotoxicidad :** El principal efecto desfavorable de la pirazinamida se presenta sobre la función hepática. Estas variaciones sintomatológicas anormales de la función hepática pueden presentarse con leves fiebres, anorexia, indisposición, sensibilidad en el hígado, hepatomegalia y esplenomegalia

y reacciones clínicamente más serias como la ictericia y en raros casos se presenta atrofia fulminante y aguda hasta la muerte. Los rangos de incidencia de hepatotoxicidad van del 2 al 20 % . Generalmente las altas dosis (59 µg/ml.) darán como resultado una alta incidencia de hepatotoxicidad (8).

**Sistema Hematopoyético :** Trombocitopenia, anemia sideroblástica, concentraciones de protombina disminuidas (8).

**Sistema Digestivo :** Náuseas, vómitos y dolores epigástricos (15).

**Piel :** Urticaria, prurito, eritema pruriginoso y fotosensibilidad (2).

**Sistema Urinario :** Alteraciones renales, alteración en los niveles de transaminasas, elevación del ácido úrico que llega a conducir a la producción de artralgia (2).

**Otros Síntomas :** Son alteraciones auditivas, psíquicas, neurológicas, síndrome gripal y albuminuria transitoria. Parte de los efectos adversos se atribuyen a la administración de dosis muy altas y a su rápida y fácil absorción por el tubo gastrointestinal, así como al metabolito (ácido prazinólico) que es la forma activa de la PZA (24).

#### 2.2.6. Precauciones.

Los exámenes de pretratamiento deben incluir :

A).- Prueba de susceptibilidad in-vitro de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.

B).- Pruebas de función hepática : Especialmente en determinaciones de transaminasas pirúvicas glutamato y transaminasa glutámico oxalacética (AST-ALT) antes y cada dos a cuatro semanas durante la terapia.

La PZA deberá utilizarse con precaución en pacientes con historial de gota, diabetes mellitus, deficiencias renales o hepáticas y en niños pequeños. No debe usarse en pacientes con daño hepático severo.

#### 2.2.7. Toxicidad.

La intoxicación aguda por PZA puede ocasionar ictericia, daño hepático que puede provocar la muerte. También pueden presentarse complicaciones cardiorrespiratorias, alteraciones renales que conducen a la acumulación de ácido úrico y producir artralgia (19).

#### 2.2.8. Interacciones con Antifímicos.

La pirazinamida se administra generalmente combinada con Isoniacida y Rifampicina. Estos fármacos tienen tres puntos en común, son absorbidos a nivel intestinal, metabolizados en el hígado y excretados principalmente por vía renal; lo cual hace posible una competencia en los procesos de metabolismo, absorción y eliminación.

Cuando se administra la PZA asociada con la Isoniacida (INH) hay una notable disminución en los niveles plasmáticos, ésta en relación a cuando se administra sola ; sin embargo se presenta un marcado sinergismo de la actividad de INH (9).

En los casos de asociación con Rifampicina (RIF) se encuentra disminución ligera en los niveles

plasmáticos y en el caso de la PZA asociada con los dos fármacos (Isoniacida y Rifampicina) la concentración plasmática disminuye notablemente. Estas diferencias en las concentraciones plasmáticas podrían explicarse mediante una modificación de la absorción intestinal (9).

La PZA en asociación con INH y Estreptomina permite obtener una mejor negativización de la tuberculosis en comparación con la asociación de INH y RIF (9).

La PZA también se ha asociado con cicloserina y etonamida, sin embargo la incidencia de toxicidad aumenta notablemente.

### 2.3. Aspectos Farmacocinéticos.

#### 2.3.1. Vías de administración.

La principal vía de administración de la PZA es la vía oral. No existe formulación para la vía intravenosa, dada su baja solubilidad en agua. En caso de usar esta vía, se administra morfazinamida que es un derivado de la pirazinamida y puede ser usado también por vía oral, por infusión (liofilizados) parenteralmente e intrapleurales (19).

#### 2.3.2. Absorción.

A las dos horas de administrar un gramo de pirazinamida por vía oral la PZA se absorbe con facilidad por vía gastrointestinal, distribuyéndose por todo el organismo. La concentración plasmática del medicamento alcanza un máximo de unos 45 µg/ml. después de 15 horas, la concentración de la sangre circulante es de 10 µg/ml.

### 2.3.3. Metabolismo.

La pirazinamida es metabolizada principalmente por el sistema microsomal hepático. La vía metabólica predominante en el hombre es una desaminación microsomal cuyo paso es inducir la formación del ácido pirazínico que es el principal metabolito y posteriormente la Xantina-Oxidasa induce la formación del ácido 5-OH-Pirazínico y 5-OH-Pa.

En menor grado el ácido pirazínico se combina con la Glicina para formar el ácido pirazínico (13).

### 2.3.4. Eliminación.

La principal vía de eliminación de la pirazinamida y sus metabolitos es por la orina. Se ha encontrado que aproximadamente el 65 % de la dosis administrada se elimina por la orina. Se han realizado diferentes estudios con el fin de determinar otras vías de eliminación posibles de pirazinamida y metabolitos y se ha encontrado de 0.8 a 1.2 % del total de la dosis administrada en la bilis de animales tratados con el medicamento (11,13).

Los valores en por ciento de la dosis excretada en orina son :

PZA = 3.8 % , PA = 36 % , 5-OH-PA = 13.8 % , 5-OH-PZA = 15.4 %

La vida media de eliminación plasmática alcanza valores del orden de  $9.8 \pm 1.8$  horas cuando se administran dosis de 1.5 a 3 g. a voluntarios sanos (13).

Se ha observado que aquellos pacientes a los cuales se les administra pirazinamida y que padecen xantiniuria, el ácido 5-hidroxipirazínico no es detectado en la orina, debido a que por la insuficiencia



de producción de xantina-oxidasa, la pirazinaamida no es deaminada ni luego oxidada para obtener el ácido 5-hidroxipirazinóico (27).

En la figura 1 se presentan los principales metabolitos de la pirazinaamida encontrados en humanos (13).

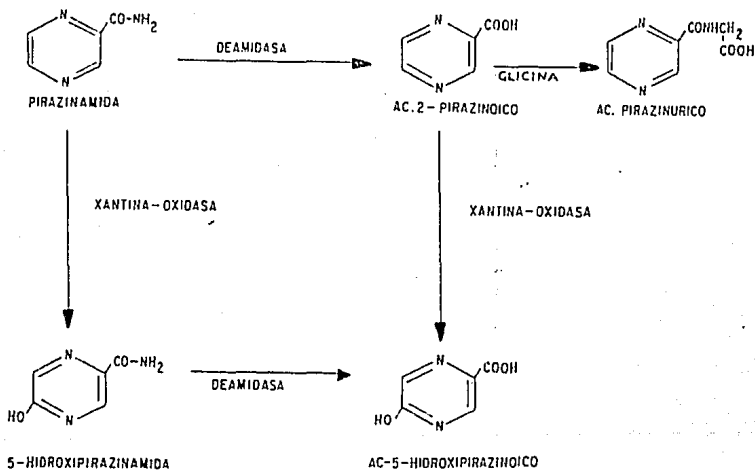


Fig. 1 PRINCIPALES METABOLITOS DE PIRAZINAMIDA EN HUMANOS

La farmacocinética de la pirazinaamida puede describirse de acuerdo a un modelo abierto de un compartimento (MAUC) con una cinética de eliminación de primer orden (13,23).

Tabla 1

PARAMETROS FARMACOCINETICOS REPORTADOS EN LA LITERATURA (25)

| DOSIS<br>(g) | T 1/2<br>(h)  | DEPURACION<br>TOTAL (ml/min) | Cp MAX<br>( $\mu$ g/ml) | T MAX<br>(h)  |
|--------------|---------------|------------------------------|-------------------------|---------------|
| 1500         | 7.3 $\pm$ 2.6 | 59.7 $\pm$ 29.5              | 41.4 $\pm$ 11.5         | 1.1 $\pm$ 0.5 |
| 2000         | 9.8 $\pm$ 1.8 | 71.0 $\pm$ 24.0              | 40.6 $\pm$ 6.4          | 1             |

T MAX = Tiempo para alcanzar la Cp MAX.

T 1/2 = Tiempo de vida media.

Cp MAX = Concentración plasmática máxima.

#### 2.4. Prueba de Disolución.

La prueba de disolución, es uno de los ensayos "IN-VITRO" cuantitativos considerados de mayor utilidad para determinar la calidad de una forma farmacéutica.

La prueba de disolución de la pirazinamida establecida en la USP XXI para la forma farmacéutica de tabletas se describe a continuación.

En cada uno de los vasos de disolución, colocar 900 ml. de agua como medio de disolución y accionar el motor a 50 rpm. durante 45 minutos, a este tiempo tomar una alícuota y filtrarla. Diluir con agua, para obtener una concentración aproximada de 10 µg/ml. de pirazinamida. Determinar la absorbancia de esta solución y de una solución de referencia en agua, conteniendo 10 µg/ml. de pirazinamida, a una longitud de onda de 268 nm. aproximadamente.

Tolerancia : No menos del 75 % (Q) disuelto en 45 minutos (5,22)

#### 2.5. Características Fundamentales que debe reunir un Método Analítico.

Las principales características con las que debe contar un método analítico son :

- 1.- Linealidad
- 2.- Límite de detección
- 3.- Precisión y exactitud
- 4.- Especificidad
- 5.- Especificidad en estabilidad
- 6.- Tolerancia
- 7.- Estabilidad de la muestra

### 2.5.1. Linealidad.

Es la habilidad de un método analítico para obtener ensayos los cuales ya sea directa o mediante una transformación matemática bien definida son proporcionales a las concentraciones del fármaco en las muestras, dentro de un intervalo determinado.

Se determina por tratamiento matemático de los resultados obtenidos del análisis de muestras con concentraciones de fármaco a lo largo del rango estipulado.

El tratamiento es el cálculo de una línea de regresión por el método de los mínimos cuadrados, de los resultados de prueba contra las concentraciones del fármaco. La pendiente de la línea de regresión y su variación proporciona una medición matemática de linealidad.

### 2.5.2. Límite de Detección.

Este se refiere a la menor cantidad detectable del compuesto de interés. El límite de detección se obtiene reduciendo las concentraciones hasta que la mínima señal sea el doble del ruido producido por la línea base.

La señal dada por el ruido indicará el límite inferior de detección al 95 % de probabilidad.

### 2.5.3. Precisión y Exactitud.

Precisión es el grado de concordancia entre los resultados de las mediciones individuales obtenidas cuando el método se aplica repetidamente sobre una muestra homogénea.

Se realiza un determinado número suficiente de ensayos de una muestra homogénea. Los análisis independientes de muestras que se han manejado siguiendo el procedimiento analítico completo. Se expresa la desviación estándar relativa, que es debida al grado de repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Exactitud es la cercanía al valor verdadero de los resultados obtenidos aplicando el método analítico.

Reproducibilidad es la correlación entre las mediciones repetidas respecto a variaciones en la operación. Tales variaciones radican en que las determinaciones son efectuadas por diferentes analistas, en diferentes equipos, en distintos laboratorios.

Se debe considerar a la vez, la variabilidad inherente a la adición del estándar en las muestras biológicas, ya que en general la adición introduce un error experimental distinto en cada método analítico.

#### 2.5.4. Especificidad.

Es el grado al cual la medición se debe sólo a la sustancia a ser determinada y no a otros componentes que puedan estar presentes en la muestra. Es una medida del grado de interferencia.

#### 2.5.5. Especificidad en estabilidad.

Un método analítico posee especificidad en estabilidad cuando ningún producto de degradación interfiere en el análisis. Si el experimento demuestra que la señal analítica sólo se debe a la sustancia de interés, el método será específico y podrá ser usado como indicador de estabilidad, en

caso contrario se deberá estimar el efecto de las otras sustancias en la señal analítica de interés y se evaluará cuando y cuanto podría interferir dicho efecto con la señal.

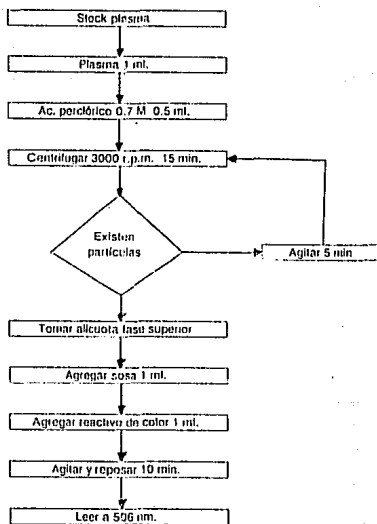
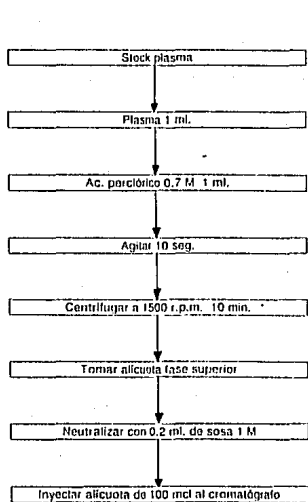
#### 2.5.6. Tolerancia del Sistema.

Indica el grado en que puede verse afectado un método analítico ya establecido, cuando se presenta una alteración en una o varias de sus condiciones iniciales (reactivos, columna, fase móvil, etc.). Para cada variable hay que calcular los parámetros cromatográficos y en cada caso establecer el efecto de la variación.

#### 2.5.7. Estabilidad de la Muestra.

Establece las condiciones óptimas de almacenamiento para muestras de fluidos biológicos; mediante la observación de algún cambio físico o químico bajo las condiciones de almacenamiento acostumbrado.

## 3.1 Diagrama de Flujo.



### **3.2 Material, Equipo y Reactivos.**

#### **3.2.1. Material Biológico.**

Plasma Humano donado por pacientes sanos en el banco de sangre.

#### **3.2.2. Material de Laboratorio.**

Matraz volumétrico : 25, 50, 100, 500 y 1000 ml.

Pipetas volumétricas : 1, 2, y 10 ml.

Pipeta graduada de 10 ml.

Probeta de 100 ml.

Tubos de ensaye de vidrio de 13 x 100.

#### **3.2.3. Equipo de Laboratorio.**

Agitador magnético (Lab-Line Pyro-Magnestir, modelo 1266).

Agitador Vortex (Sybron Thermolyne, modelo M-126715.).

Balanza analítica (Meller, modelo H54-AR).

Bomba Waters (Millipore, modelo M-45).

Centrifuga (Damon/IEC - Division, modelo HN-SII).

Cromatógrafo de Líquidos (Waters Millipore de longitud de onda variable, modelo 481).

Espectrofotómetro (Beckman, modelo DU-68).

Integrador Waters (Millipore, modelo 745-B).

Microjeringa para cromatografía de líquidos (Microliter, Hamilton, modelo 810).



### 3.2.4. Reactivos.

Acido perclórico (grado reactivo) (J. T. Baker)

Agua destilada y desionizada.

Alopurinol. (donado amablemente por los laboratorios MAVI, S.A. PRODUCTOS).

Fosfato de potasio monobásico (reactivo analítico) (J. T. Baker).

Fosfato de sodio dibásico, dodecahidratado (reactivo analítico) (J. T. Baker).

Lentejas de hidróxido de sodio (reactivo analítico) (J. T. Baker).

Metanol (grado HPLC) (Mallinckrodt).

Nitroprusiato de sodio (reactivo analítico) (donado amablemente por los laboratorios de química orgánica de la Facultad de Química Unidad de Posgrado de la U.N.A.M.).

Pirazinamida (donada amablemente por los laboratorios FISONS DE MEXICO, S.A. DE C.V.).

#### 3.2.4.1. Preparación de Reactivos.

SOLUCION DE ACIDO PERCLORICO 0.7 M. Tomar una alícuota de 2.5 ml. de ácido perclórico y colocar en un matraz de 25 ml. que contiene una pequeña cantidad de agua, posteriormente aforar al volumen.

SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO 1 M. Pesar 20 gramos de lentejas de hidróxido de sodio, y aforar con agua destilada a 500 ml.

SOLUCION DE NITROPRUSIATO DE SODIO 1 M. Pesar 100 mg. de nitroprusiato de sodio y aforar con agua destilada a 100 ml.

SOLUCION ESTANDAR DE PIRAZINAMIDA. Pesar 50 mg. de pirazinamida, aforar con agua

destilada a 50 ml, para obtener una concentración final de un miligramo (STOCK).

SOLUCION DE FOSFATO MONOBASICO DE POTASIO 0.02 M. Pesar 1.136 g. de fosfato monobásico de potasio y aforar con agua deionizada a un volumen de 500 ml. (Solución A).

SOLUCION DE FOSFATO DE SODIO DODECAHIDRATADO 0.02 M. Pesar 3.581 g. de fosfato dibásico de sodio dodecahidratado y aforar con agua deionizada a un volumen de 500 ml. (Solución B).

SOLUCION DE FASE MOVIL DE FOSFATOS. Mezclar 20 ml. de solución A con 80 ml. de la solución B. Una vez mezclada medir 98 ml. y adicionar 2 ml. de metanol grado HPLC (Fosfato - Metanol 98 : 2).

### 3.3 Metodología.

#### 3.3.1. Curvas Patrón.

Curva de Calibración para el Método Espectrofotométrico.

Para la curva de calibración de pirazinamida efectuar diluciones a partir de una solución stock conteniendo una concentración de 1000 µg/ml, de ella tomar 15 ml y aforar a un volumen de 100 ml quedando una concentración final de 150 µg/ml en solución acuosa o en plasma, para obtener la concentración de 100 µg/ml tomar 5 ml. del stock y diluir con 50 ml. Para una concentración final de 50 µg/ml se debe tomar 5 ml de la solución stock y aforar con 100 ml en solución acuosa o en plasma; ésta solución será denominada como solución C ya que a partir de ella se obtendrá el siguiente punto de la curva de calibración, así pues tomar 25 ml de la solución C y aforar a un volumen de 50 ml quedando como concentración final 25 µg/ml. Para la última concentración de la

curva tomar 0.50 ml de la solución stock y aforar a 50 ml de plasma o agua dando una concentración de 10 µg/ ml.

En la tabla 2 se puede observar el procedimiento efectuado.

TABLA 2  
CURVA PATRON PARA ESPECTROFOTOMETRIA

| SOLUCION STOCK<br>VOLUMEN (ml) | AFORO CON PLASMA<br>O SOLUCION ACUOSA<br>(ml) | CONCENTRACION FINAL<br>( g/ml) |
|--------------------------------|---|--------------------------------|
| 15                             | 100   | 150                            |
| 5                              | 50  | 100                            |
| 5                              | 100   | 50<br>(Sol. C)                 |
| 25<br>(tomado de Sol.C)        | 50  | 20                             |
| 0.5                            | 50  | 10                             |

NOTA : La curva debe realizarse tanto en plasma como en solución acuosa.

### Curva de Calibración para el Método Cromatográfico.

Para la curva de calibración de pirazinamida preparar las siguientes concentraciones a partir de una solución stock conteniendo una concentración de 1000 µg/ml.

Tomar 1 ml de la solución stock y aforar con 10 ml para dar una concentración final de 100 µg/ml.

Para obtener el siguiente punto de 80 µg/ml, tomar 0.8 ml de la solución stock y aforar con 10 ml de agua o plasma, para obtener 40 µg/ml de concentración final tomar 0.4 ml de la solución stock y aforar a 10 ml de plasma o agua, así mismo para la concentración siguiente de 20 µg/ml tomar una alícuota de 0.2 ml a partir del stock y aforar a 10 ml y por último la concentración de 10 será obtenida tomando 0.1 ml y aforando a 20 ml con agua o plasma.

En la tabla 3 se muestra de forma tabular el procedimiento efectuado.

TABLA 3  
CURVA PATRON PARA CROMATOGRAFIA

| SOLUCION STOCK<br>VOLUMEN (ml) | AFORO CON PLASMA<br>O SOLUCION ACUOSA<br>(ml) | CONCENTRACION FINAL<br>( g/ml) |
|--------------------------------|---|--------------------------------|
| 1.0                            | 10  | 100                            |
| 0.8                            | 10  | 80                             |
| 0.4                            | 10  | 40                             |
| 0.2                            | 10  | 20                             |
| 0.1                            | 10  | 10                             |

NOTA : La curva debe realizarse tanto en plasma como en solución acuosa.

### 3.3.2. Validación de los Métodos.

Los parámetros utilizados para validar los métodos (cromatográfico y espectrofotométrico) fueron: linealidad, límite de detección, precisión y exactitud, especificidad en estabilidad, tolerancia y estabilidad de la muestra.

En cuanto a la LINEALIDAD, preparar tres curvas a concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 150  $\mu\text{g/ml}$  en diferentes días para el método espectrofotométrico, tanto en solución acuosa, como en plasma; y de 10, 20, 40, 80 y 100  $\mu\text{g}$  por ml en diferentes días para el método cromatográfico, tanto en solución acuosa como en plasma, con el propósito de determinar si los valores de absorbancias o medición de alturas de dichas concentraciones presentan un comportamiento lineal.

De los datos obtenidos, calcular el intercepto, pendiente y coeficiente de correlación.

Determinar la concentración mínima detectable preparando diluciones en plasma y solución acuosa de PZA, a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, y 10  $\mu\text{g}$  por ml utilizando el método de análisis.

Para evaluar la PRECISION, preparar tres curvas patrón a concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 150  $\mu\text{g/ml}$  (método espectrofotométrico) y 10, 20, 40, 80 y 100  $\mu\text{g/ml}$  (método cromatográfico) y hacer repeticiones en diferentes días.

De los datos calcular la absorbancia promedio, alturas promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación en porciento para cada una de las concentraciones.

Determinar la EXACTITUD calculando el rendimiento de extracción a partir de los datos obtenidos de las tres curvas de calibración, en solución, en relación a las de plasma.

Evaluar la ESPECIFICIDAD haciendo un "pool" de plasma, al cual se le adicionan diferentes fármacos, con el fin de observar si después de adicionar dichos fármacos existe alteración. Los fármacos a adicionar son: Isoniacida y Rifampicina.

Evaluar la ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD Y ESTABILIDAD DE LA MUESTRA, para observar si después de almacenar la muestra en diferentes condiciones : medio ambiente, refrigeración y congelación existen productos de degradación biológicos ( proteínas plasmáticas degradadas o degradación del producto mismo) que pueden intervenir con la cuantificación de la PZA.

Realizar la evaluación preparando muestras en solución y plasma a concentraciones de 50 µg/ml. El proceso de extracción efectuarlo en los días 1, 7, 10, 15 y 30, después de almacenada la muestra.

Calcular la TOLERANCIA DEL SISTEMA; utilizando diferentes columnas (C18 echosphere) así como diferentes valores de pH y proporciones de fase móvil. Proceder a disminuir y aumentar la longitud de onda a partir del rango establecido (258 nm); así como el flujo y volumen de inyección.

### 3.4 Procesamiento de la Muestra (Método Espectrofotométrico).

A 1 ml de cada uno de los puntos de la curva, añadir 1 ml de ácido perclórico 0.7 M para precipitar proteínas, agitar y centrifugar durante 15 minutos a 3000 r.p.m., en caso de que después de centrifugar queden partículas, agitar y centrifugar nuevamente; en caso contrario separar la fase acuosa y proceder a alcalinizar las muestras con 1 ml de solución de hidróxido de sodio 1 M., agitar y adicionar 1 ml de solución de nitroprusiato de sodio (reactivo de color), mezclar bien.

Dejar en reposo durante un lapso de 10 minutos para desarrollar por completo el complejo colorido.

Leer las muestras a una longitud de 506 nm.

### 3.5 Procesamiento de la Muestra (Método Cromatográfico).

Tomar un mililitro de plasma y añadir 1 ml de ácido perclórico 0.7 M, agitar durante 10 minutos en un vortex, centrifugar por 10 minutos a 1500 r.p.m. Tomar la fase acuosa superior y neutralizar con solución de hidróxido de sodio 1 M. Agitar e inyectar una alícuota de 100 microlitros en el cromatógrafo.

#### 3.5.1. Condiciones Cromatográficas.

Columna : longitud 30 cm, diámetro externo 4.6 mm.

Fase estacionaria : Echonosphere C18, tamaño de partícula 5 micras. Alltech.

Fase móvil : Mezcla de solución amortiguadora de fosfatos - metanol (98:2 v/v).

Flujo : 1.2 ml/min.

Velocidad de Carta : 0.25 cm/min.

## 4.1 Resultados.

## VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS.

## LINEALIDAD DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA CUANTIFICACION DE PIRAZINAMIDA EN SOLUCION ACUOSA Y PLASMA.

En las Tablas I y II se muestran los resultados de las absorbancias obtenidas en el rango de concentraciones de 10 a 150  $\mu\text{g/ml}$  de pirazinamida en solución, así como el coeficiente de variación en por ciento (0.23433 - 0.74493 y 0 - 0.5084 de un día y otro). Mediante un análisis de regresión lineal promedio se obtuvo la ecuación de una línea recta con pendiente (m) de 0.008092, intercepto (b) de -0.00974833, y un coeficiente de correlación (r) de 0.99998 en un día y en el otro una pendiente de 0.008067, de intercepto -0.00385 y de coeficiente de correlación de 0.99998. Las gráficas correspondientes se indican en las Fig. I y II.

En las Tablas III y IV se presentan los coeficientes de variación en por ciento obtenidos en dos días diferentes (0 - 9.0329923 y 1.2414 - 6.8879956) en el intervalo de concentraciones de 10 - 150  $\mu\text{g/ml}$  de pirazinamida en plasma. Mediante un análisis de regresión, se obtuvo la ecuación de una línea recta con pendiente (m) de 0.006332, intercepto (b) de 0.0100225 y un coeficiente de correlación (r) de 0.9964136 en un día y en el otro una pendiente de 0.0059732, intercepto de 0.0230630 y un coeficiente de correlación de 0.99898.

En las gráficas No. III y IV, se muestra la relación lineal entre los valores de las concentraciones y el promedio de las absorbancias.



**PORCENTAJE DE RECUPERACION.** La tabla V muestra el porcentaje de recuperación de pirazinamida en plasma, que fué de 85.31 % de un día y de otro 82.29 %.

**EXACTITUD.** La propiedad del método de proporcionar resultados cuantitativos, lo más cercanos al valor real se demostró estadísticamente a partir de los datos del porcentaje de recuperación promedio ( $85.31 \pm 3.02$ ) y determinando el intervalo de confianza al 95 %. Los valores obtenidos se encuentran en la Tabla V.

**PRECISION.** De los datos obtenidos se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación en por ciento para cada una de las concentraciones Tablas I, II, III y IV.

**LIMITE DE DETECCION.** Teniendo presente que este se define como la menor cantidad detectable del compuesto por analizar que puede medirse respecto a la señal provocada, al ir reduciendo las concentraciones los resultados indicaron que el detector no discrimina a concentraciones menores de 10 µg/ml, registrándose una respuesta en forma de línea recta a partir de esta concentración.

**ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD Y ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.** En la Tabla VI se presentan los resultados obtenidos preparando soluciones de PZA a concentraciones de 50 µg/ml bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

**TOLERANCIA DEL SISTEMA.** Se utilizaron diferentes volúmenes de solución de hidróxido de sodio variando el pH, observando si se desarrollaba o no el complejo de color.

**ESPECIFICIDAD DEL METODO.** Se realizaron pruebas con otros medicamentos antituberculosos como Rifampicina e Isoniacida a concentraciones de 50 µg/ml en solución acuosa y en plasma. La señal del espectrofotómetro no dió muestra alguna de interferencias, ya que no forman complejo colorido ni

dan lectura a la longitud de onda de 506 nm.

**LINEARIDAD DEL METODO DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.** Los resultados acerca de la linealidad del método se presentan en las tablas VII y VIII, donde se muestran los valores de las alturas así como el intercepto, pendiente y correlación de 6 curvas patrón de PZA tanto en plasma como en solución acuosa. En las fig. V, VI, VII, y VIII se indica la representación gráfica de los resultados obtenidos.

**CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE.** Teniendo presente que el límite de detección se define como la menor cantidad detectable del compuesto por analizar que puede medirse respecto a la señal provocada por el ruido, al ir reduciendo las concentraciones, los resultados indicaron que el detector no discriminaba abajo de los 10 µg/ml, registrándose en el cromatograma una respuesta en forma de línea recta (igual a la línea base) por abajo de esa concentración.

**PRECISION.** Los resultados obtenidos acerca de la Precisión del método se encuentran en las Tablas No. VII, VIII, IX y X, tanto en solución acuosa como en plasma.

**EXACTITUD.** En las Tablas No. XI y XII se muestran los resultados del rendimiento de extracción, calculado a partir de los datos obtenidos al procesar las tres curvas patrón (tanto en plasma como en solución acuosa) de un día y otro, utilizadas para la evaluación de la linealidad del método.

**ESPECIFICIDAD.** Se evaluó preparando unas muestras de plasma a las cuales se les adicionaron diferentes fármacos. Los fármacos adicionados fueron la Rifampicina e Isoniacida. En la Fig. IX se presentan los cromatogramas típicos en los cuales no se observan interferencias.

**ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD Y LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.** Los resultados obtenidos al variar las condiciones ambientales Tabla XIII, y condiciones cromatográficas para conocer la Tolerancia del Sistema, se pueden resumir de la siguiente forma :

**a)- DETECTOR.**

LONGITUD DE ONDA, MENOR DE 268 nm, (250 nm) se obtuvo una señal del pico, y ruido en la línea base, lo cual provocaría una mala cuantificación en muestras a concentración menor.

LONGITUD DE ONDA MAYOR DE 268 nm, (268 nm) se encontró menor señal del pico de pirazinamida, lo cual también impide cuantificar adecuadamente concentraciones menores.

**b)- COLUMNA.**

En columnas diferentes de Echosphere C18 no hay variación de la resolución de los picos.

**c)- FASE MOVIL.**

Al variar la proporción Buffer - Metanol, no hay modificación en cuanto a la resolución y tiempo de retención del pico, lo cual indica que puede modificarse en los límites amplios ( $\pm 10$  ml).

Al variar el pH de la fase móvil lo que ocasiona es una alteración en el tiempo de retención, a pH ácido menor tiempo de retención, mientras que a pH básico mayor tiempo de retención.

**d)- FLUJO.**

Al aumentar éste la resolución sigue siendo buena.

**e)- VOLUMEN INYECTADO.**

Se puede aumentar el volumen de inyección hasta 200 microlitros y con ello la metodología es mejor.

Se puede utilizar un volumen mínimo de 15 microlitros y es de esperarse que si se incrementa éste volumen la eficiencia es mejor lo cual es una ventaja considerando que el fármaco puede ser monitoreado.

TABLA I.

RESULTADOS DE VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA CUANTIFICACION DE PIRAZINAMIDA EN SOLUCION (1er. dia)

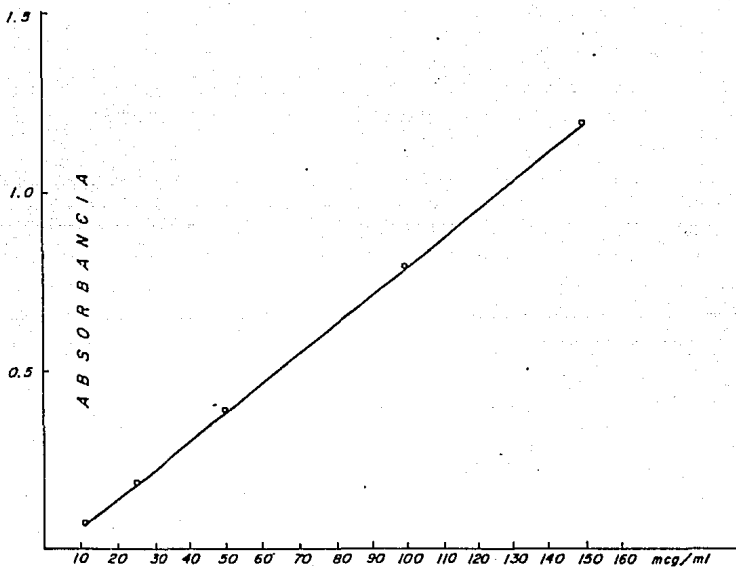
| VALORES DE ABSORBANCIAS EN SOLUCION |         |         |         |         |        |        |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| CONC (mcg/ml)                       | 1       | 2       | 3       | MEDIA   | D.S.   | % C.V. |
| 10                                  | 0.0730  | 0.0720  | 0.0720  | 0.0723  | 0.0004 | 0.6517 |
| 25                                  | 0.1990  | 0.1990  | 0.2000  | 0.1993  | 0.0004 | 0.2364 |
| 50                                  | 0.4030  | 0.4030  | 0.4010  | 0.4023  | 0.0009 | 0.2343 |
| 100                                 | 0.8060  | 0.8060  | 0.8060  | 0.8060  | 0.0000 | 0.0000 |
| 150                                 | 1.2000  | 1.2020  | 1.2200  | 1.2073  | 0.0089 | 0.7449 |
| CORRELACION :                       | 0.9999  | 0.9999  | 0.9999  | 0.9999  |        |        |
| PENDIENTE :                         | 0.0080  | 0.0080  | 0.0081  | 0.0080  |        |        |
| INTERCEPTO :                        | -0.0027 | -0.0036 | -0.0077 | -0.0047 |        |        |

TABLA II.

RESULTADOS DE VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA CUANTIFICACION DE PIRAZINAMIDA EN SOLUCION (2o. dia)

| VALORES DE ABSORBANCIAS EN SOLUCION |         |         |         |         |        |        |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| CONC (mcg/ml)                       | 1       | 2       | 3       | MEDIA   | D.S.   | % C.V. |
| 10                                  | 0.0730  | 0.0730  | 0.0730  | 0.0730  | 0.0000 | 0.0000 |
| 25                                  | 0.2000  | 0.2000  | 0.2000  | 0.2000  | 0.0000 | 0.0000 |
| 50                                  | 0.4020  | 0.4020  | 0.4020  | 0.4020  | 0.0000 | 0.0000 |
| 100                                 | 0.8050  | 0.8030  | 0.8050  | 0.8043  | 0.0009 | 0.1172 |
| 150                                 | 1.2010  | 1.2140  | 1.2010  | 1.2053  | 0.0061 | 0.5084 |
| CORRELACION :                       | 0.9999  | 0.9999  | 0.9997  | 0.9999  |        |        |
| PENDIENTE :                         | 0.0080  | 0.0081  | 0.0080  | 0.0080  |        |        |
| INTERCEPTO :                        | -0.0028 | -0.0049 | -0.0020 | -0.0038 |        |        |

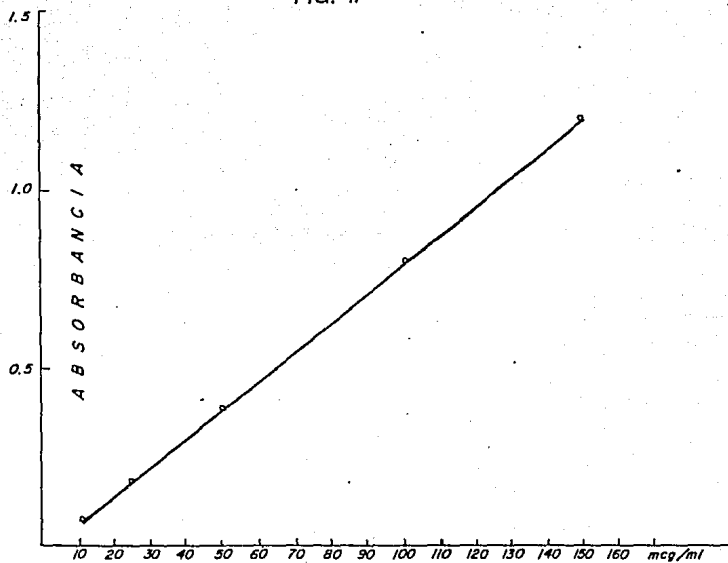
FIG. 1



$r: 0.9999$   
 $m: 0.0080926$   
 $b: -0.00474833$

**LINEARIDAD DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO  
PARA LA CUANTIFICACION DE PIRAZINAMIDA  
EN SOLUCION. (DIA 1)**

FIG. II



$r: 0.9999830$

$m: 0.008067$

$b: -0.00385$

**LINEARIDAD DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO  
PARA LA CUANTIFICACION DE PIRAZINAMIDA  
EN SOLUCION. (DIA 2)**



TABLA III.

RESULTADOS DE VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA CUANTIFICACION DE PIRAZINAMIDA EN PLASMA (1er. dia)

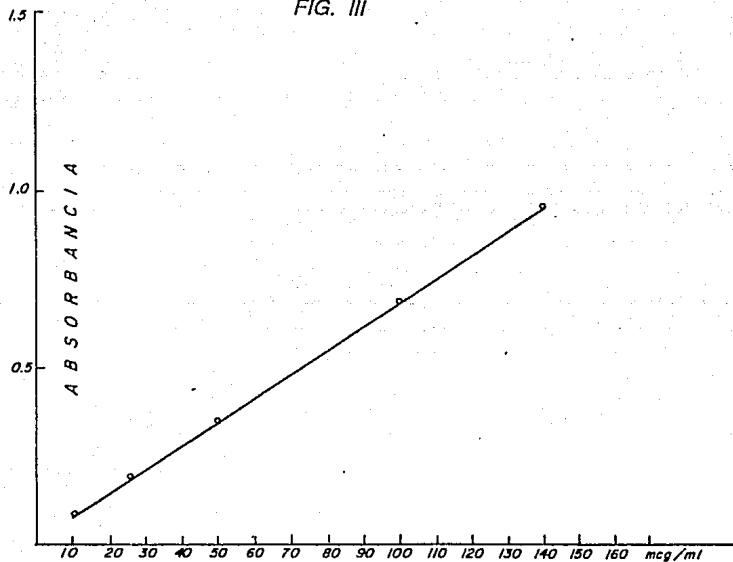
| VALORES DE ABSORBANCIAS EN PLASMA |         |         |        |        |        |        |
|-----------------------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| CONC (mcg/ml)                     | 1       | 2       | 3      | MEDIA  | D.S.   | % C.V. |
| 10                                | 0.0750  | 0.0690  | 0.0740 | 0.0726 | 0.0026 | 3.6152 |
| 25                                | 0.1370  | 0.1350  | 0.1450 | 0.1390 | 0.0043 | 3.1082 |
| 50                                | 0.3220  | 0.4020  | 0.3610 | 0.3616 | 0.0326 | 9.0329 |
| 100                               | 0.6012  | 0.6260  | 0.7030 | 0.6483 | 0.0400 | 6.1712 |
| 150                               | 0.9420  | 0.9500  | 0.9570 | 0.9496 | 0.0061 | 0.6453 |
| CORRELACION :                     | 0.9993  | 0.9932  | 0.9964 | 0.9979 |        |        |
| PENDIENTE :                       | 0.0062  | 0.0062  | 0.0064 | 0.0063 |        |        |
| INTERCEPTO :                      | -0.0004 | -0.0172 | 0.0131 | 0.0099 |        |        |

TABLA IV.

RESULTADOS DE VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA CUANTIFICACION DE PIRAZINAMIDA EN PLASMA (2o. dia)

| VALORES DE ABSORBANCIAS EN PLASMA |        |        |        |        |        |        |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CONC (mcg/ml)                     | 1      | 2      | 3      | MEDIA  | D.S.   | % C.V. |
| 10                                | 0.0780 | 0.0680 | 0.0680 | 0.0713 | 0.0047 | 6.6084 |
| 25                                | 0.1770 | 0.1720 | 0.1730 | 0.1740 | 0.0021 | 1.2414 |
| 50                                | 0.3120 | 0.3570 | 0.3020 | 0.3236 | 0.0239 | 7.3906 |
| 100                               | 0.6570 | 0.6420 | 0.6340 | 0.6443 | 0.0095 | 1.4796 |
| 150                               | 0.9760 | 0.9090 | 0.8240 | 0.9030 | 0.0621 | 1.4796 |
| CORRELACION :                     | 0.9995 | 0.998  | 0.9948 | 0.9989 |        |        |
| PENDIENTE :                       | 0.0079 | 0.0064 | 0.0059 | 0.0059 |        |        |
| INTERCEPTO :                      | 0.0086 | 0.0286 | 0.0317 | 0.023  |        |        |

FIG. III



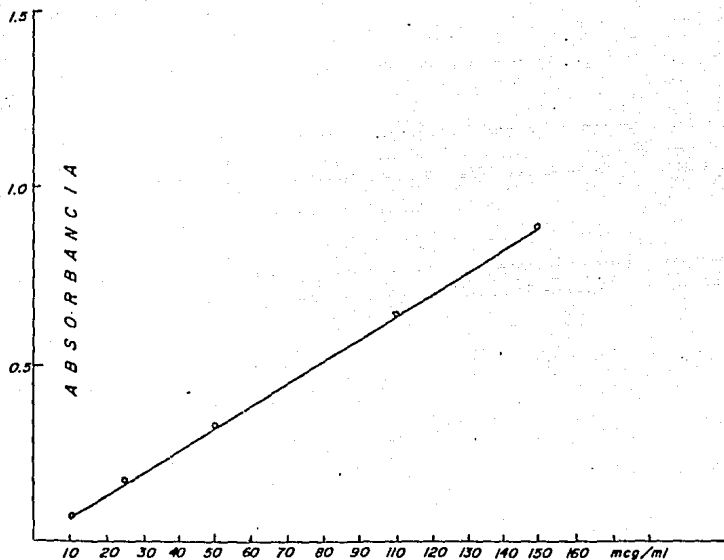
$r: 0.9964136$

$m: 0.006332$

$b: 0.0100225$

LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO .  
PARA LA CUANTIFICACION DE PIRAZINAMIDA  
EN PLASMA. (DIA 1)

FIG. IV



$r: 0.99898$

$b: 0.02306$

$m: 0.00597$

**LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO  
PARA LA CUANTIFICACION DE PIRAZINAMIDA  
EN PLASMA. (DIA 2)**

TABLA V.

RECUPERACION

| PLASMA 1er. DIA   |                   |               |
|-------------------|-------------------|---------------|
| mcg/ml ADICIONADO | mcg/ml RECUPERADO | %RECUPERACION |
| 10                | 9.710             | 97.100        |
| 25                | 18.166            | 72.664        |
| 50                | 46.489            | 92.978        |
| 100               | 82.968            | 82.968        |
| 150               | 121.300           | 80.866        |
| PLASMA 2o. DIA    |                   |               |
| mcg/ml ADICIONADO | mcg/ml RECUPERADO | %RECUPERACION |
| 10                | 8.668             | 86.68         |
| 25                | 21.640            | 86.56         |
| 50                | 40.550            | 81.10         |
| 100               | 81.066            | 81.06         |
| 150               | 113.749           | 75.83         |

TABLA VI.

ESTABILIDAD DE MUESTRAS DE PIRAZINAMIDA POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO  
(CONCENTRACION DE 50 mcg/ml)

| CONDICIONES        |                |               |             |        |        |                |               |             |        |        |
|--------------------|----------------|---------------|-------------|--------|--------|----------------|---------------|-------------|--------|--------|
| EN SOLUCION ACUOSA |                |               |             |        |        | EN PLASMA      |               |             |        |        |
| DIA                | MEDIO AMBIENTE | REFRIGERACION | CONGELACION | 35° C  | 45° C  | MEDIO AMBIENTE | REFRIGERACION | CONGELACION | 35° C  | 45° C  |
| 1                  | 0.3980         | 0.3740        | 0.3840      | 0.3720 | 0.3610 | 0.3520         | 0.3580        | 0.3910      | 0.3600 | 0.3540 |
| 7                  | 0.5320         | 0.5510        | 0.4610      | 0.5160 | 0.6980 | 0.2300         | 0.4020        | 0.3900      | 0.3470 | 0.2590 |
| 10                 | 0.4220         | 0.4370        | 0.4230      | 0.4340 | 0.5290 | 0.1430         | 0.2620        | 0.3960      | 0.0800 | 0.0770 |
| 15                 | 0.4360         | 0.4200        | 0.4300      | 0.4210 | 0.4100 | 0.1670         | 0.3600        | 0.3900      | 0.0760 | 0.0330 |
| 30                 | 0.4560         | 0.4160        | 0.4200      | 0.4000 | 0.4000 | 0.2000         | 0.4000        | 0.4100      | 0.0560 | 0.0000 |

TABLA VII.

RESULTADOS DE VALIDACION DEL METODO CLAR PARA LA CUANTIFICACION  
DE PIRAZINAMIDA EN SOLUCION (1er. dia)

| CONC (mcg/ml) | VALORES DE ALTURAS EN SOLUCION |         |         |         |        |        |
|---------------|--------------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|
|               | 1                              | 2       | 3       | MEDIA   | D.S.   | % C.V. |
| 10            | 0.1960                         | 0.1960  | 0.1950  | 0.1950  | 0.0004 | 0.2410 |
| 20            | 0.3590                         | 0.3540  | 0.3570  | 0.3560  | 0.0020 | 0.5770 |
| 40            | 0.6660                         | 0.6660  | 0.6660  | 0.6660  | 0.0000 | 0.0000 |
| 80            | 1.5370                         | 1.5170  | 1.5000  | 1.5180  | 0.0151 | 0.9960 |
| 100           | 1.8630                         | 1.8400  | 1.8600  | 1.8540  | 0.0102 | 0.5500 |
| CORRELACION : | 0.9982                         | 0.9984  | 0.9987  | 0.9985  |        |        |
| PENDIENTE :   | 0.0189                         | 0.0187  | 0.0188  | 0.0188  |        |        |
| INTERCEPTO :  | -0.0257                        | -0.0219 | -0.0246 | -0.0247 |        |        |

TABLA VIII.

RESULTADOS DE VALIDACION DEL METODO CLAR PARA LA CUANTIFICACION  
DE PIRAZINAMIDA EN SOLUCION (2o. dia)

| VALORES DE ALTURAS EN SOLUCION |         |         |         |         |        |        |
|--------------------------------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| CONC (mcg/ml)                  | 1       | 2       | 3       | MEDIA   | D.S.   | % C.V. |
| 10                             | 0.1420  | 0.1480  | 0.1460  | 0.1450  | 0.0024 | 1.7200 |
| 20                             | 0.3210  | 0.3260  | 0.3200  | 0.3220  | 0.0026 | 0.8150 |
| 40                             | 0.6790  | 0.6610  | 0.6920  | 0.6770  | 0.0127 | 1.8770 |
| 80                             | 1.4450  | 1.4150  | 1.4150  | 1.4250  | 0.0146 | 1.0250 |
| 100                            | 1.6600  | 1.6850  | 1.6110  | 1.6520  | 0.0307 | 1.8600 |
| CORRELACION :                  | 0.9974  | 0.999   | 0.9967  | 0.998   |        |        |
| PENDIENTE :                    | 0.0173  | 0.0173  | 0.0167  | 0.0171  |        |        |
| INTERCEPTO :                   | -0.0194 | -0.0229 | -0.0018 | -0.0151 |        |        |



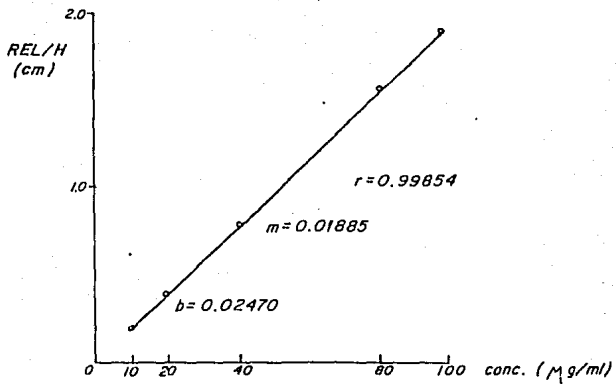


FIG. V LINEARIDAD DE PIRAZINAMIDA EN SOLUCION POR EL METODO DE CLAR. (DIA 1)

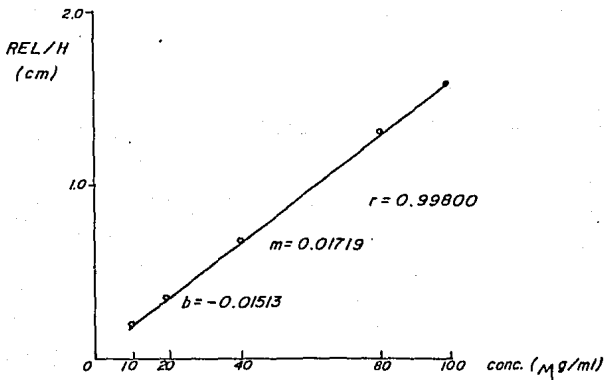


FIG. VI LINEARIDAD DE PIRAZINAMIDA EN SOLUCION POR EL METODO DE CLAR. (DIA 2)

h/11

TABLA IX.

RESULTADOS DE VALIDACION DEL METODO CLAR PARA LA CUANTIFICACION  
DE PIRAZINAMIDA EN PLASMA (1er. día)

|               |          | VALORES DE ALTURAS EN PLASMA |        |        |        |        |        |
|---------------|----------|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CONC (mcg/ml) | SOLUCION | 1                            | 2      | 3      | MEDIA  | D.S.   | % C.V. |
| 10            | 0.2850   | 0.2720                       | 0.2330 | 0.2500 | 0.2510 | 0.0195 | 7.7860 |
| 20            | 0.4330   | 0.3770                       | 0.3790 | 0.4120 | 0.3890 | 0.0196 | 5.0530 |
| 40            | 0.5470   | 0.5290                       | 0.5290 | 0.5590 | 0.5390 | 0.0173 | 3.2130 |
| 80            | 1.0000   | 1.0930                       | 1.0000 | 1.0280 | 1.0400 | 0.0477 | 4.5870 |
| 100           | 1.2730   | 1.2460                       | 1.1500 | 1.2430 | 1.2130 | 0.0545 | 4.4990 |
| CORRELACION : | 0.9950   | 0.9951                       | 0.9973 | 0.9985 | 0.9976 |        |        |
| PENDIENTE :   | 0.0106   | 0.0112                       | 0.0102 | 0.0108 | 0.0107 |        |        |
| INTERCEPTO :  | 0.1760   | 0.1399                       | 0.1455 | 0.1552 | 0.1468 |        |        |

TABLA X.

RESULTADOS DE VALIDACION DEL METODO CLAR PARA LA CUANTIFICACION  
DE PIRAZINAMIDA EN PLASMA (2o. dia)

| VALORES DE ALTURAS EN PLASMA |          |        |        |        |        |        |         |
|------------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| CONC (mcg/ml)                | SOLUCION | 1      | 2      | 3      | MEDIA  | D.S.   | % C.V.  |
| 10                           | 0.2680   | 0.2500 | 0.2570 | 0.2110 | 0.2390 | 0.0247 | 10.3720 |
| 20                           | 0.4370   | 0.4160 | 0.3470 | 0.3520 | 0.3700 | 0.0367 | 9.9320  |
| 40                           | 0.5470   | 0.5210 | 0.5240 | 0.5260 | 0.5260 | 0.0025 | 0.9980  |
| 80                           | 1.1360   | 1.0050 | 0.9840 | 1.0000 | 0.9960 | 0.0109 | 2.1280  |
| 100                          | 1.2770   | 1.2770 | 1.3840 | 1.2110 | 1.2900 | 0.0873 | 6.7680  |
| CORRELACION :                | 0.9925   | 0.9945 | 0.9905 | 0.9991 | 0.9967 |        |         |
| PENDIENTE :                  | 0.0114   | 0.0110 | 0.0121 | 0.0110 | 0.0114 |        |         |
| INTERCEPTO :                 | 0.1610   | 0.1412 | 0.0910 | 0.1075 | 0.1137 |        |         |

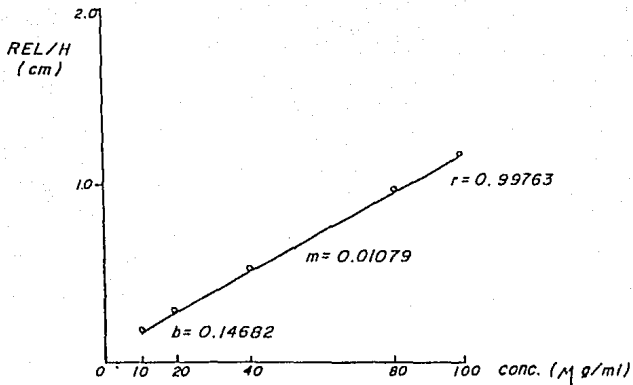


FIG. VII LINEARIDAD DE PIRAZINAMIDA EN PLASMA POR EL METODO DE CLAR. (DIA 1)

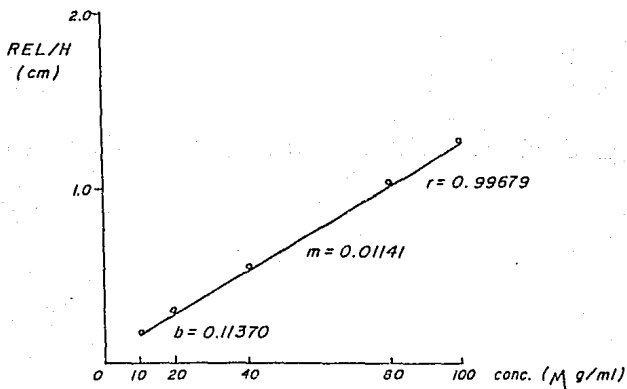


FIG. VIII LINEARIDAD DE PIRAZINAMIDA EN PLASMA POR EL METODO DE CLAR. (DIA 2)

TABLA XI.

RECUPERACION

| PLASMA 1er. DIA      |                       |                        |                    |
|----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|
| CONC. ( $\mu$ g/ml.) | $\mu$ g/ml ADICIONADO | $\mu$ g/ml. RECUPERADO | % g/ml. RECUPERADO |
| 100                  | 100                   | 97.537                 | 97.537             |
| 80                   | 80                    | 81.256                 | 101.581            |
| 40                   | 40                    | 34.141                 | 85.532             |
| 20                   | 20                    | 20.032                 | 100.150            |
| 10                   | 10                    | 7.052                  | 70.520             |

TABLA XII.

## RECUPERACION

| PLASMA 2o. DIA              |                            |                            |                               |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| CONC. ( $\mu\text{g/ml.}$ ) | $\text{Mg/ml. ADICIONADO}$ | $\text{Mg/ml. RECUPERADO}$ | $\% \text{ g/ml. RECUPERADO}$ |
| 100                         | 100                        | 98.695                     | 98.695                        |
| 80                          | 80                         | 72.992                     | 91.240                        |
| 40                          | 40                         | 31.906                     | 80.000                        |
| 20                          | 20                         | 18.264                     | 91.320                        |
| 10                          | 10                         | 6.811                      | 68.110                        |

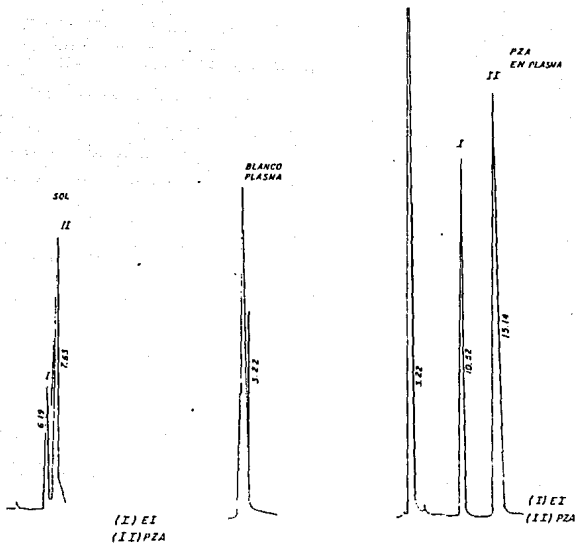
TABLA XIII.

ESTABILIDAD DE MUESTRAS DE PIRAZINAMIDA POR EL METODO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

| CONDICIONES        |                |               |             |                |               |             |
|--------------------|----------------|---------------|-------------|----------------|---------------|-------------|
| EN SOLUCION ACUOSA |                |               |             | EN PLASMA      |               |             |
| DIA                | MEDIO AMBIENTE | REFRIGERACION | CONGELACION | MEDIO AMBIENTE | REFRIGERACION | CONGELACION |
| 1                  | 0.541          | 0.535         | 0.542       | 0.529          | 0.525         | 0.526       |
| 7                  | 0.400          | 0.542         | 0.540       | 0.421          | 0.528         | 0.535       |
| 30                 | *              | 0.541         | 0.547       | *              | 0.529         | 0.525       |

NOTA: \* NO DETERMINADO.

FIG. IX



CROMATOGRAMA TÍPICO DE PIRAZINAMIDA  
EN PLASMA Y SOLUCIÓN



#### 4.2 DISCUSION.

Se seleccionó el método espectrofotométrico propuesto por Caccla por ser fácil, con un tratamiento sencillo y rápido.

El método desarrollado utilizó : (4)

1.- Solución de Nitroprusiato de sodio recién preparado que produce un complejo colorido.

Las muestras van desde un rojo hasta un anaranjado.

2.- Una longitud de onda de 506 nm, ya que es donde se presenta máxima absorción del complejo colorido desarrollado.

3.- El tratamiento de extracción es sencillo y rápido, incluye una precipitación de proteínas con ácido perclórico 0.7 M, agitación, centrifugación y alcalinización de la muestra; obteniéndose una buena limpieza de la muestra.

El método desarrollado presentó linealidad en el intervalo de concentración de 10 a 150  $\mu\text{g/ml}$ , con un coeficiente de correlación  $r = 0.9990$  en solución acuosa y de  $0.9970$  en plasma, estos valores son adecuados de acuerdo a los criterios establecidos para la linealidad de un método.

La REPETIBILIDAD en diferentes días se determinó para evaluar la precisión.

El método presenta repetibilidad en diferentes días, ya que el valor del coeficiente de variación más alto es de 6.068 % para una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  en plasma.

Los valores de los porcentos de recuperación, en el intervalo de 10 a 150  $\mu\text{g/ml}$  indican que la recuperación es buena, considerando la gran afinidad de la PZA a las proteínas plasmáticas. Dado

que este valor se encuentra dentro del límite aceptado para la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, se confirma la validez del método desarrollado

Para conocer la EXACTITUD del método, los porcentos de recuperación citados con anterioridad, fueron sometidos a un análisis de varianza, encontrándose un valor de 0.14754, siendo el valor en tablas de 2.00210 para una probabilidad de 0.05, lo cual indica que no existen diferencias estadísticamente significativas por lo que el método puede considerarse exacto.

En cuanto a la ESPECIFICIDAD DE LA MUESTRA, se observa que no existe ninguna interferencia entre el fármaco analizado que es la PZA y las proteínas plasmáticas. Así mismo, no existen diferencias al adicionar otros antifímicos : Isoniacida y Rifampicina que son utilizados conjuntamente con Pirazinamida en el tratamiento de la Tuberculosis.

Acerca de la ESTABILIDAD DE LA MUESTRA, las muestras de pirazinamida fueron almacenadas y posteriormente se evaluaron con el fin de observar su comportamiento y ver si se presentaban productos de degradación del plasma o del fármaco, los cuales impedirían la cuantificación adecuada del mismo. Dicha evaluación se hizo preparando soluciones en plasma y en solución acuosa.

Las condiciones de almacenamiento de las muestras fueron :

- Medio Ambiente.
- Refrigeración.
- Congelación (0° C - 20° C).
- Temperatura (35° C - 45° C).

De acuerdo a los resultados se observa que la pirazinamida no presenta degradación en solución acuosa, sin embargo en plasma hay una degradación del casi 50 % en las muestras almacenadas en medio ambiente, una degradación total de la pirazinamida a los 30 días a temperatura de 45 ° C y 35 ° C, mientras que en refrigeración y congelación se conserva en buen estado.

Por lo expuesto anteriormente se recomienda almacenar las muestras en congelación, pudiendo así disponer de un lapso mínimo de un mes para su análisis sin degradación alguna.

En TOLERANCIA DEL SISTEMA, después de haber efectuado variaciones en los volúmenes de hidróxido de sodio agregados a la muestra para variar el pH de la misma, se observa que a menor pH, es decir menores de 8, la formación del complejo de color se ve afectado, mientras que a pH más alcalino 9 - 14 se desarrolla mejor el complejo colorido.

Otro método seleccionado fué el de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), que es un método más sensible que el espectrofotométrico.

En el método CLAR se utilizó :

- 1.- Fase móvil, compuesta de mezcla de fosfatos 0.02 M : Metanol en una proporción 98 :2 (V/V).
- 2.- Una longitud de onda máxima de 268 nm.
- 3.- Una columna de fase reversa C18 echonosphere Alltech.
- 4.- El tratamiento de limpieza de la muestra Incluyó la precipitación de proteínas con ácido perclórico 0.7 M., agitación, centrifugación y neutralización de la muestra, con ello la muestra presenta mejor respuesta y sensibilidad del método. Siendo éste método de limpieza fácil, sencillo y rápido en comparación a otros reportados.

Las características que se evaluaron para validar el método fueron: Linealidad, Límite de detección, Precisión y exactitud, Especificidad, Especificidad en estabilidad, Tolerancia y Estabilidad de la muestra.

El método desarrollado presentó buena linealidad en el intervalo de concentraciones de 10 a 100 µg por ml, con un coeficiente de correlación de 0.998 en solución acuosa y de 0.997 en plasma, demostrando así que cumple con las especificaciones establecidas para evaluar la linealidad de un método.

Para la PRECISION se prepararon curvas patrón en el intervalo de concentraciones de 10 a 100 µg por ml, haciéndose repeticiones. El método es repetible en diferentes días, observándose que el coeficiente de variación mayor es de 10.372 para una concentración de 10 µg/ml en plasma

Se encontró un valor promedio de recuperación de 88.48 % en el intervalo de concentración de 10 a 100 µg/ml, indicando con ello que la recuperación o extracción de la muestra es buena.

En cuanto a la EXACTITUD del método, los porcentos de recuperación fueron sometidos a un análisis de varianza, encontrándose un valor de  $F = 0.29539$ . Dado que el valor en Tablas es de 2.00210 con una  $P < 0.05$  se demuestra que no existen diferencias significativas, por lo tanto el método propuesto puede considerarse exacto.

En ESPECIFICIDAD DE LA MUESTRA no se observaron interferencias entre la PZA y las proteínas plasmáticas, ni con antifímicos adicionados : Rifampicina e Isoniacida, que son los fármacos administrados conjuntamente con la PZA en el tratamiento de la Tuberculosis.

Para conocer la ESTABILIDAD DE LA MUESTRA, las muestras de PZA se evaluaron con el fin de observar si después del almacenamiento se presentaban productos de degradación, ya sea del plasma o de la PZA , los cuales impedirían la cuantificación adecuada de éste último. Dicha evaluación se hizo preparando dos tipos de grupos uno en plasma y otro en solución acuosa de PZA a concentraciones de 50 µg/ml.

Cada uno de éstos grupos fué sometido a diferentes condiciones de almacenamiento (medio ambiente, congelación y refrigeración). El proceso de extracción se llevó a cabo del 1er día a 7 y 30 días.

La pirazinamida permanece estable tanto en refrigeración como en congelación, por lo cual se aconseja almacenarla de preferencia en congelación teniendo un margen mínimo de un mes para su análisis.

Para evaluar la TOLERANCIA DEL SISTEMA se utilizaron diferentes columnas C18, echonosphere marca Alltech así como diferentes valores de pH y proporciones de fase móvil. Cuando se utilizaron diversas columnas (dos) no existió variación en la resolución de los picos, al variar el pH las muestras presentan un intervalo muy amplio para poder modificar su tiempo de retención, y en cuanto a las proporciones de la fase móvil aumentando o disminuyendo el metanol no existen cambios significativos en las respuestas.

Se desarrollaron dos métodos analíticos para cuantificar pirazinamida en plasma : un espectrofotométrico y un método de cromatografía líquida de alta resolución, los cuales cumplen con las siguientes características.

El método espectrofotométrico es lineal en el intervalo de concentraciones de 10 a 150  $\mu\text{g/ml}$ , con un coeficiente de correlación de 0.9990 y un límite inferior de detección de 5  $\mu\text{g/ml}$ .

El método presenta repetibilidad, ya que su coeficiente de variación se encuentra entre 6.6084 y 0.6453.

El promedio de recuperación es de 83.78 %, con una desviación estándar  $S = 0.00002$  y un coeficiente de variación  $\% C.V = 4.6180$  lo que indica que el método es exacto.

El método es específico en presencia de otros antituberculosos como Rifampicina (RIF) e Isoniacida (INH).

Las muestras que contienen pirazinamida son estables en congelación durante 30 días. Si la muestra se almacena en refrigeración se mantiene también estable por el mismo lapso.

Este método presenta como ventaja que es de bajo costo, rápido y fácil.

En base a estas características; se recomienda el uso de este método para el monitoreo de niveles de pirazinamida en pacientes en el estado estacionario.

El método de cromatografía de líquidos de alta resolución es lineal en el intervalo de concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{g/ml}$  con un coeficiente de correlación de 0.998 y un límite de detección inferior de 2  $\mu\text{g/ml}$ .

El método es reproducible, ya que su coeficiente de variación se encuentra entre 10.372 y 0.998.

El promedio de recuperación es de 88.468 %, con una desviación estándar de  $S = 0.03209$  y un porcentaje de coeficiente de variación de 5.5338, por lo que el método es exacto.

El método es específico en presencia de otros antimicrobianos como la Rifampicina e Isoniacida (fármacos que se administran en la terapia para el tratamiento de la tuberculosis).

Las muestras conteniendo PZA son estables tanto en refrigeración como en congelación durante 30 días .

El método presenta como ventajas una fácil extracción, sin embargo es más sensible que el espectrofotométrico, por lo que se recomienda para estudios de farmacocinética clínica en pacientes bajo tratamiento, y puede utilizarse para el monitoreo de niveles de PZA en pacientes en estado estacionario.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Akinosho B.O.O. Pyrazinamide in the treatment of tuberculosis. Actes d'un Symposium tenu à Alger les 1er et 2 avril. 25 - 29 (1979).
- 2.- Angel J. H. Toxicity of Pyrazinamide in the combination chemotherapy of pulmonary tuberculosis. Actes d'un Symposium tenu à Alger les 1er et 2 avril. 119 - 125 (1979).
- 3.- Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 105; 34 - 44 (1988).
- 4.- Brouard A., Barreteau H. Rapid determination of Pyrazinamide in biological fluids by High - Performance Liquid Chromatography. J. Chromatog 345; 453 - 456 (1985).
- 5.- Caccia. P. A. Spectrophotometric determination of Pyrazinamide in blood. Am. Rev. Tuber. Pul. Dis. 75: 105 - 110 (1957).
- 6.- Chan K, Wong C. L., Lok S. High-Performance Liquid Chromatography Determination of Pyrazinamide in cerebrospinal Fluid and Plasma in the Rabbit. J. Chromatog 380; 367 - 373 (1986).
- 7.- CONTROL Y TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Secretaría de Salud, México, 1987.
- 8.- Cussedik N.; Ait Khaled N. Tolérance et toxicité du Pyrazinamide dans des régime comportant trois au quatre drogues au cours de la phase initiale. Actes d'un Symposium tenu à Alger les 1er et 2 avril. 127 - 133 (1979).

ESTÁ TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



- 9.- Fox. W. The therapeutic results of the British Medical Research Council associated collaborative studies of Pyrazinamide containing regimens. Actes d'un Symposium tenu à Alger les 1er et 2 avril. 103 - 113 (1979).
- 10.- Frogan Ross. Pyrazinamide and others Drugs in Tuberculosis Meningitis. Lancet 379 (1973).
- 11.- Gialdroni G, Grassi. Caractéristiques pharmacologiques et métabolisme du Pyrazinamide chez l'homme. Actes d'un Symposium tenu à Alger les 1er et 2 avril. 31 - 34 (1979).
- 12.- Heifets Leonid. Is the Pyrazinamide Bactericidal against Mycobacterium tuberculosis? Am. Rev. Res. Dis. 141, 1; 250 - 252 (1990).
- 13.- Lacroix C. Interaction Between allopurinol and Pyrazinamide. Eur. Resp Journal. 1, 807 - 811 (1988).
- 14.- Larbaoui D. Le Pyrazinamide, 25 ans après. Actes d'un Symposium tenu à Alger les 1er et 2 avril. 15 - 20 (1979).
- 15.- Larbaoui D, Lamrani Z. Tolérance et toxicité de régimens "lourds" comportant le Pyrazinamide dans le traitement de la tuberculose pulmonaire commune. Actes d'un Symposium tenu à Alger les 1er et 2 avril. 137 - 145 (1979).
- 16.- Mackness. The Intracellular Activation of Pyrazinamide and Nicotinamide. Am. Rev. Resp. Dis. 74, 710; 727 (1956).

- 17.- Malone, Schurr L. The effect of Pyrazinamide (Aldinamide) on experimental tuberculosis in mice. Am. Rev. Tuberc. 39; 319 - 320 (1954).
- 18.- Mc. Dermott W. Tompsel R. Activation of Pyrazinamide and Nicotinamide in acidic environment in vitro. Am. Rev. Tuberc. 70; 748 (1954).
- 19.- Miret P, Balada E; Piña J. M. Etude rétrospective de l'utilisation du Pyrazinamide. Actes d'un Symposium tenu à Alger les loer et 2 avril. 67 - 71 (1970).
- 20.- O'Brien R. J. Tuberculosis drugs old and new. Am. Rev. Resp. Dis. 134; 305 - 311 (1985).
- 21.- Rosenstein Emilio. LIBRO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS. 35a. edición. Editado por Ediciones P.L.M., S. A. México D. F. 1989.
- 22.- U. S. P. XXI . Editado por Enlon Company 1985.
- 23.- Vayre P., Chambraud E. Etude Pharmacocinétique du Pyrazinamide et de l'acide pirazinoïque chez le sujet à fonction rénale normale et l'insuffisant rénal. Pharmacologie Clinique. Ther. 44, 1 - 4 (1989)
- 24.- V.B. Lippincott Co. FACTS AND COMPARISONS DIVISION. II West Port Plaza, Suite 423. St. Louis, Missouri, USA.
- 25.- Welner and Tinker. Pharmacology of Pyrazinamide: Metabolic and renal function studies related to the mechanism of drug induced urate retention. J. Pharml. Exp. Ther. 180; 411 - 434 (1972).

26.- Windholz Martha. The Merck Index. Ninth edition. Merck and Co., Inc. Rahway, New Jersey, USA, 1981.

27.- Yamamoto Tetsuya, Higashino Kasuya. Metabolism of Pyrazinamide and allopurinol in hereditary xanthine oxidase deficiency. Clin. Chem. Acta 180; 169 - 176 (1989).

28.- Zierski M. Le Pyrazinamide 25 ans après. Actes d'un Symposium tenu á Alger les 1er et 2 avril . 1 (1979).