

43
20je.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA
CUANTIFICACION DE ISONIACIDA EN SALIVA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ROSALBA LOURDES NAVA FIGUEROA**

**ASESOR DE TESIS: M.en C BEATRIZ RAMIREZ MORA
COASESOR DE TESIS: QFB JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS**

**·TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN U. N. A. M.
SECRETARIA ACADEMICA FACULTAD DE ESTUDIOS
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR SUPERIORES CUAUTITLAN
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
"desarrollo y validación de un método espectrofotométrico
para la cuantificación de isoniacida en saliva".

que presenta la pasante: Rosalba Lourdes Nava Figueroa
con número de cuenta: 8409489-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 27 de enero de 1991

PRESIDENTE	<u>Me. en C. Luisa Martínez Agilar</u>	<i>[Firma]</i>
VOCAL	<u>Q.F.B. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	<i>[Firma]</i>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. José A. Garduño Rosas</u>	<i>[Firma]</i>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera</u>	<i>[Firma]</i>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Lidia Rangel Trujano</u>	<i>[Firma]</i>

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL IPN BAJO LA DIRECCIÓN DE M. EN C. BEATRÍZ RAMÍREZ MORA Y LA COLABORACIÓN DE Q. F. B. JOSÉ A. GARDUÑO A QUIENES AGRADESCO SU PROFESIONALISMO, GUÍA Y TIEMPO CEDIDO.

A DIOS

Y A MIS PADRES:

Sr. Francisco Nava Figueroa
Sra. Margarita Figueroa de Nava

a ustedes solo puedo decirles GRACIAS.

A MI ESPOSO Y A MI HIJA:

Juan Espinosa Montaño y Elenore Elisa Espinosa Nava

porque juntos enfrentamos con valor los retos y aprendemos los pequeños detalles que hace valer nuestra existencia.

A MIS HERMANOS:

Manuel Roman
Miguel Alberto
Javier
María Isabel
Jorge Luis
Francisco

por nuestras vivencias.

A MIS SOBRINOS:

Jesús Emmanuel
Indira
Carolina
Alberto Miguel
Jorge Francisco
Alma Josefina
Estefanía

a Sara

a todos mis traviesos con cariño.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN, A SU
DEPARTAMENTO DE FARMACIA.

A LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL IPN, A SU
DEPARTAMENTO DE FARMACIA.

A todos los maestros que influyeron positivamente en mi vida académica.

De manera especial a mi directora de tesis Bety, por su confianza, amabilidad, empeño, amistad, paciencia y trato afable.

Agradesco a el jurado que tan amablemente colaboró para mejorar la presentación de este trabajo.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron con su ayuda oportuna y sincera a la realización de este trabajo. Muy especialmente a QFB Martha Patricia González García.

A la generación 87-91, QFB.

INDICE

	Pág.
Lista de figuras	i
Lista de tablas	ii
Lista de apéndices	iii
Lista de diagramas de flujo	iv
RESUMEN	vi
1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. GENERALIDADES DE ISONIACIDA	4-9
3.1. Nombre y fórmula	4
3.2. Propiedades	4
3.3. Historia y síntesis	5
3.4. Acción terapéutica	6
3.5. Mecanismo de acción	6
3.6. Farmacocinética	6
3.7. Dosis	7
3.8. Estabilidad	7
3.9. Métodos cuantitativos	8
4. TUBERCULOSIS	10-12
4.1. Agente etiológico	10
4.2. Reservorio y fuente de infección	11
4.3. Modo de transmisión	11
4.4. Sintomatología	11
4.5. Tratamiento	11
4.6. La isoniacida como el antituberculoso primario	12
5. GENERALIDADES DE LA MUESTRA SALIVA	13-15
5.1. Constitución	13
5.2. pH	14
5.3. Volumen de saliva y cambios fisiológicos	14
5.4. Métodos de obtención	15

6.	PROCEDIMIENTOS INVASIVOS Y NO INVASIVOS EMPLEADOS EN EL SEGUIMIENTO DE NIVELES DE FÁRMACOS	16-20
6.1.	Concentración de fármacos en saliva	17
6.2.	Factores que afectan la relación de la concentración de fármaco, (saliva/plasma)	17
6.3.	Precaución en la interpretación de los niveles salivales de fármacos	19
7.	GENERALIDADES DE VALIDACIÓN	21-24
7.1.	Definición	21
7.2.	Necesidad de la validación	21
7.3.	Linealidad	22
7.3.1.	Linealidad del sistema	22
7.3.2.	Linealidad del método	22
7.4.	Precisión	23
7.4.1.	Exactitud	23
7.5.	Límite de detección	23
7.6.	Límite de cuantificación	24
8.	FUNDAMENTO DEL TEMA EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA	25-26
9.	PARTE EXPERIMENTAL	27-37
9.1.	Etapa de desarrollo	30
9.1.1.	Procedimientos básicos	30
9.1.2.	Factores que influyen en el método de elección	30
9.1.3.	Influencia del agua destilada y desionizada en el desarrollo de la reacción de color	30
9.1.4.	Efecto del volumen de agente complejante (A. C.)	30
9.1.5.	Efecto del solvente en la extracción	31
9.1.6.	Efecto del agente que produce el efecto salting out en la extracción	31
9.1.7.	Efecto del tipo y tiempo de agitación en la extracción	31
9.1.8.	Efecto del pH	32
9.1.9.	Ensayo previo pH = 7, efecto del sistema	32

9.1.10. Efecto de la proporción de solventes en la mezcla seleccionada para la extracción de isoniácida en saliva	32
9.1.11. Influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica	32
9.1.12. Influencia del volumen de la mezcla de solventes butanol:cloroformo 60:40 y la cantidad de sulfato de amonio en la extracción de isoniácida de la muestra	32
9.1.13. Ensayo preliminar del método desarrollado para la cuantificación de isoniácida en saliva	33
9.1.2. Etapa de validación	35
10. RESULTADOS	38-78
10.1. Etapa de desarrollo	39
10.1.1. Procedimiento básico 1	39
10.1.2. Procedimiento básico 2	39
10.2. Etapa de validación	41
11. DISCUSIÓN	79-86
12. CONCLUSIONES	87
13. BIBLIOGRAFÍA	103-110

LISTA DE FIGURAS

i

1. Efecto del volumen de agente complejante.
2. Influencia del pH sobre el % de recobro de isoniacida en el sistema butanol:agua.
3. Influencia del % de la mezcla butanol:cloroformo en el % recuperado.
4. Influencia del pH sobre el % de recobro de isoniacida (INH): butanol:cloroformo 60:40/saliva.
5. Ensayo preliminar, curva de calibración isoniacida (INH)-saliva.
6. Linealidad del sistema, curva de calibración isoniacida (INH)-agua.
7. Linealidad del método, curva de calibración isoniacida (INH)-saliva.
8. Curva concentración añadida contra concentración recuperada.
9. Límite de cuantificación y de detección.

1. Agentes precipitantes de proteínas probados (A. P. P.).
2. Influencia del agua destilada y desionizada en el desarrollo de la reacción de color.
3. Efecto del volumen de agente complejante (A.C.).
4. Datos del porcentaje de recobro de isoniácida obtenidos en los sistemas de solventes A, B Y C.
5. Datos del porcentaje de recobro de isoniácida obtenidos en los sistemas de solventes B Y C.
6. Datos de la influencia del pH sobre el porcentaje de recobro de isoniácida en el sistema butanol/agua.
7. Datos del porcentaje de recobro de isoniácida obtenidos en el sistema de solventes D.
8. Datos del porcentaje de recobro de isoniácida obtenidos en los sistemas de solventes C Y E.
9. Datos del porcentaje de isoniácida recuperada en muestras de saliva adicionada (6 mcg/ml de INH) con respecto a la proporción de la mezcla butanol:cloroformo.
10. Datos estadísticos para la evaluación de la proporción de la mezcla butanol:cloroformo más adecuada.
11. Influencia del pH sobre el porcentaje de recobro de isoniácida en el sistema butanol:cloroformo 60:40/ saliva adicionada (6 mcg/ml de INH).
12. Datos estadísticos para la evaluación del pH de extracción óptimo en el sistema butanol:cloroformo 60:40/saliva adicionada (6 mcg/ml de INH).
13. Influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo, en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica.
14. Influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo, en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica.
15. Prueba de medias para el análisis de la influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo, en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica.
16. Influencia del volumen de la mezcla de solventes butanol:cloroformo 60:40 y de los gramos de sulfato de amonio en la extracción de isoniácida en saliva adicionada (6 mcg/ml de INH).
17. Datos estadísticos para la evaluación de la influencia del volumen de la mezcla de solventes butanol:cloroformo 60:40 y de los gramos de sulfato de amonio en la extracción de isoniácida en saliva adicionada (6 mcg/ml de INH).
18. Datos del ensayo preliminar del método modificado para la cuantificación de isoniácida en saliva, Curva de calibración de placebos añadidos de INH/saliva.

19. Linealidad del sistema.
20. Datos estadísticos para la evaluación de la linealidad del sistema.
21. Parámetros estadísticos evaluados en la linealidad del sistema para isoniacida.
22. Parámetros estadísticos evaluados en la unión de los datos de la linealidad del sistema para isoniacida.
23. Precisión del sistema.
24. Parámetros estadísticos evaluados en la precisión del sistema.
25. Linealidad del método.
26. Datos estadísticos para la evaluación del método para isoniacida en saliva adicionada.
27. Parámetros estadísticos evaluados en la linealidad del método para isoniacida en saliva adicionada.
28. Parámetros estadísticos evaluados en la unión de los datos de la linealidad del método para isoniacida en saliva adicionada.
29. Datos de la curva de concentración recuperada vs concentración añadida.
30. Datos estadísticos para la evaluación de la concentración recuperada en función de la concentración añadida.
31. Parámetros estadísticos evaluados en la relación concentración recuperada vs concentración añadida en la linealidad del método para isoniacida en saliva adicionada.
32. Exactitud y precisión.
33. Análisis de varianza para exactitud y repetibilidad del método.
34. Parámetros estadísticos para la evaluación de la exactitud y precisión del método.
35. Pull de salivas.
36. Análisis de varianza para el pull de salivas.
37. Prueba de medias para el pull de salivas.
38. Límite de cuantificación y de detección.
39. Parámetros estadísticos evaluados para el límite de detección y de cuantificación.
40. Sistema base INH/agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2.
41. Sistema primario INH/agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2.
42. Curva de calibración INH/agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2.
43. Curva de calibración primaria de placebos añadidos de INH/saliva.
44. Curva de calibración de placebos añadidos de INH/saliva.

LISTA DE APÉNDICES

iv

1. Método de Prodomos.
2. Sistemas base, primarios y curvas de calibración de INH/AGUA e INH/SALIVA.
3. Fórmulas estadísticas y criterios utilizados en la evaluación de los parámetros de validación del método analítico.

RESUMEN

El Mycobacterium tuberculosis es el agente etiológico de la tuberculosis, enfermedad infecciosa que puede seguir un curso agudo o crónico. Esta enfermedad se encuentra entre las principales enfermedades causantes de un grave problema de salud a nivel mundial. Esto se debe en parte a su ciclo epidemiológico, a sus formas de contagio y a su difícil control.

Hoy día la tuberculosis es prevenible y curable gracias a la disposición de agentes terapéuticos eficaces.

La isoniacida es el agente quimioterapéutico de primera línea considerado como el antituberculoso primario. Sin embargo, la acetilación de la isoniacida en el organismo humano está determinada genéticamente y existen dos subpoblaciones: Acetiladores lentos y acetiladores rápidos. La determinación del fenotipo acetilador es clínicamente importante porque el grado de susceptibilidad a la hepatotoxicidad de la isoniacida es mayor en los acetiladores lentos y el establecimiento de un régimen efectivo depende del tiempo de vida media de isoniacida en el individuo, el cual está determinado por el tipo acetilador.

Para lograr la determinación del tipo acetilador mediante estudios biofarmacocinéticos se necesita del desarrollo de métodos analíticos para cuantificar isoniacida en fluidos biológicos. Para usar de tales métodos con fines terapéuticos en la diferenciación entre estos dos fenotipos se necesita que se caractericen por su sensibilidad, sencillez, bajo costo y confiabilidad, factibles de realizarse en laboratorios y equipo de uso común como son los de hospitales de atención primaria y centros de investigación.

Se han implementado métodos espectrofotométricos para la determinación de isoniacida en suero y orina. Sin embargo, los métodos desarrollados para su cuantificación en saliva no poseen características adecuadas.

El principal objetivo del presente trabajo de tesis

fué desarrollar y validar un método espectrofotométrico que permita la cuantificación de los niveles salivales de isoniacida de manera confiable, sencilla y de bajo costo, el cual sea susceptible de adaptarse en estudios farmacocinéticos. Se realizó en cuatro fases principales: La información documental; la etapa de desarrollo, en la que se tomo como referencia la adaptación parcial considerando diferentes métodos analíticos elegidos por su facilidad; la tercera etapa consistió en que una vez elegido el método más adecuado para los fines del estudio se procedio a optimizar las variables experimentales principales. La cuarta y última etapa la constituyó la validación del método analítico propuesto estableciendo su confiabilidad. mediante el protocolo adecuado.

De los dos procedimientos básicos adaptados para la limpieza de la muestra el elegido como el adecuado consiste en la extracción de la isoniacida de la matriz biológica (saliva) en un sistema de solventes (butanol:cloroformo) con la adición de una sal la cual provoca el efecto salting out adecuado (sulfato de amonio) seguido de una reextracción final de la fase orgánica con ácido clorhídrico 0.1 N mediante agitación mecánica. Aplicando finalmente el método espectrofotométrico de Prodrornos modificado, el cual consiste en llevar la solución ácida final a un pH de 5 +/- 0.2 más la adición del reactivo Ortofenantrolina-Hierro (III) llevando a un volumen e incubando en baño María a 50° C +/- 0.5° C para dar lugar a la reacción entre éste reactivo y la isoniacida presente en la muestra formando el complejo quelante colorido Isoniacida-Ortofenantrolina-Hierro (II), el cual absorbe en el espectro a 510 nm, permitiendo la cuantificación del principio activo en el intervalo de concentraciones de interés, de 2 a 10 mcg/ml.

En el desarrollo y estandarización del método se encontró que los valores óptimos para las variables experimentales principales son: pH de extracción de la muestra de 7.5, mezcla de solventes butanol:cloroformo (60:40), volumen de la mezcla de solventes 10 ml, uno y medio gramos de sulfato de amonio para la producción del efecto salting out, tiempo de agitación de dos minutos en vortex para la extracción antes y después de la adición de la sal, centrifugación a 2000 rpm durante 17 minutos, recuperación de fase orgánica con pipeta Pasteur, reextracción con ácido clorhídrico (4 ml, 0.1 N) por agitación mecánica durante treinta minutos a una inclinación de 20°, adición de 400 mcl de reactivo y es necesario el uso de agua desionizada ajustada a pH de 5.

En la fase final de validación se encontró que el sistema es lineal y preciso con un coeficiente de regresión mayor a 0.99 en el intervalo de concentraciones de 0.8 a 10.0 mcg/ml, con una pendiente de 0.149698, una ordenada al origen de 0.053196 y un coeficiente de variación global de 1.25 %. El método es lineal y repetible en el intervalo de concentraciones de 2 a 10 mcg/ml, con un coeficiente de regresión mayor a 0.99, una pendiente de 0.122279, una ordenada al origen de -0.005365 y un coeficiente de variación global de 1.77 %. La relación entre la concentración recuperada y concentración añadida es de tipo lineal con un coeficiente de regresión mayor a 0.99, una pendiente de 0.7791788, una ordenada al origen de -0.208125 y un coeficiente de variación global de 2.14 %.

En el estudio sobre la exactitud y precisión del método se encontró que es reproducible inter e intra día, es repetible y exacto con respecto a la concentración y al día-concentración. Desde un punto de vista práctico el método se puede considerar exacto y repetible ya que los porcentajes de recuperación son cercanos al 100 % y el coeficiente de variación es menor al 3 % si consideramos que se aceptan coeficientes de variación en métodos que manejen fluidos biológicos hasta del 10 %. Al realizar un estudio para determinar la reproducibilidad entre individuos se encontraron diferencias muy significativas estadísticamente hablando, esto se debe tomar en cuenta en la adaptación del método a estudios de farmacocinética, recomendándose correr blancos a diferentes tiempos para cada uno de los individuos en estudio un día o dos antes. Esta diferencia se atribuye a la constitución de la saliva la cual varía con respecto a la hora del día, a la edad, etc., sin embargo, la diferencia encontrada mediante parámetros estadísticos no resulta significativa para fines prácticos ya que la diferencia en el porcentaje de recobro no es mayor del 7 %.

Con el método modificado en estudio se obtuvo un porcentaje de extracción de 79.18 % y tiene un límite de cuantificación de 1.376 mcg/ml.

De lo anterior se concluye que tanto el sistema como el método propuestos son lineales y cumplen satisfactoriamente con los parámetros de exactitud, repetibilidad y precisión. El método tiene un procedimiento largo pero sencillo, exacto y confiable estadísticamente hablando para los fines del estudio y perfectamente adaptable en la determinación de la farmacocinética de isoniacida en individuos sanos y pacientes para la optimización de la terapia antituberculosa establecida.

1. OBJETIVOS

DESARROLLAR UN MÉTODO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO QUE PERMITA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ISONICÁMIDA EN MUESTRAS DE SALIVA.

DETERMINAR LA INFLUENCIA QUE TIENEN LOS FACTORES EXPERIMENTALES PRINCIPALES (COMO SON : pH DE EXTRACCIÓN, VOLUMEN DE AGENTE COMPLEJANTE, TIPO DE SOLVENTES Y LA PROPORCIÓN DE UNA MEZCLA DE SOLVENTES DE EXTRACCIÓN) EN LA CUANTIFICACIÓN.

VALIDAR EL MÉTODO ANALÍTICO PROPUESTO.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmisibles son un problema de salud importante en México y países subdesarrollados. Esto se debe en gran parte al nivel socioeconómico del país reflejado en las deficientes condiciones sanitarias y el grado de malnutrición presentes en la población. Estos factores y el modo de transmisión permiten la extensión de las enfermedades de este tipo dificultando su control. Este es el caso de la tuberculosis, enfermedad infecciosa que se encuentra entre las catorce principales enfermedades causantes de defunciones en los años 90's aún en países desarrollados como Estados Unidos.

La isoniacida es el quimioterapéutico de elección en el tratamiento de corta y larga duración para la tuberculosis. Considerándose como el más potente y barato; se emplea con otros fármacos como la rifampicina, estreptomocina, etambutol y pirazinamida para evitar que se genere resistencia microbiana. Su biotransformación está determinada genéticamente, lo que puede influir en la respuesta terapéutica. Esto hace necesaria la existencia de métodos cuantitativos aplicables a fluidos biológicos para determinar esta característica metabólica en la población, mediante estudios farmacocinéticos en los individuos.

El presente trabajo de tesis forma parte de un proyecto cuyo objetivo general es establecer las bases de la terapia antituberculosa, que permitan optimizar el régimen de corta duración establecido por la Secretaría de Salud en el país. Los métodos reportados en la bibliografía para la cuantificación de isoniacida en muestras biológicas son escasos y la mayoría se caracteriza por utilizar aparatos de alto costo, además de utilizar un método invasivo en la toma de muestras ya que determinan la concentración de isoniacida en plasma. Existe así la necesidad de contar con métodos de análisis para cuantificarla en otros fluidos biológicos como es la saliva, que puede obtenerse con facilidad y no provoca estrés en el paciente. Es de preferencia que estos métodos se basen en técnicas más accesibles como las espectrofotométricas, dado que el equipo para llevarlas a cabo forma parte común de laboratorios de salud pública y de investigación.

El motivo de esta investigación fué desarrollar y validar un método analítico sencillo y de bajo costo que permita cuantificar isoniacida en saliva y se realizó en cuatro fases principales: La investigación documental; la segunda etapa o etapa de desarrollo, en la que se tomo como referencia la adaptación parcial considerando diferentes métodos analíticos elegidos por su facilidad; la tercera etapa consistió en que una vez elegido el método más adecuado para los fines del estudio se procedió a optimizar las variables experimentales principales . La cuarta y última etapa la constituyó la validación del método analítico propuesto estableciendo su confiabilidad.

3. GENERALIDADES DE ISONIACIDA

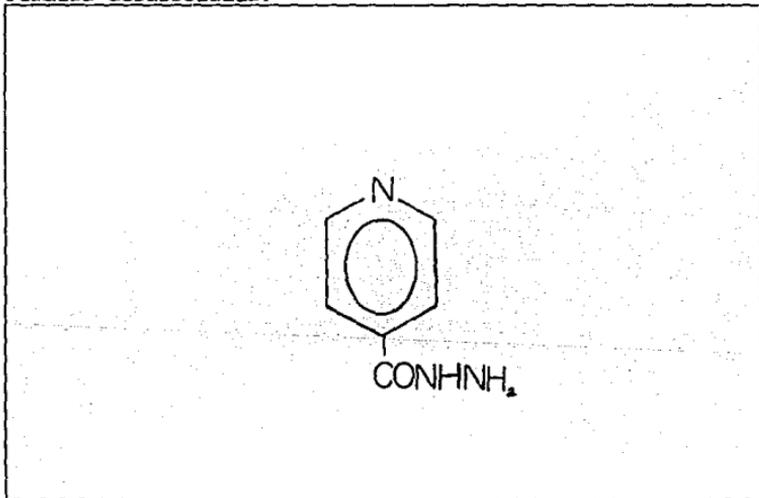
3.1. Nombre y fórmula

Su nombre genérico es ISONIACIDA, INH, Hidrazida del ácido isonicotínico, HAIN, Isonicotinilhidrazida, Tubazida, Nidrazida (1, 3, 4, 5, 6, 7).

Nombre químico: 4-piridin hidrazida del ácido carboxílico.
 Piridin 4-carboxil hidrazida.
 Piridin-hidrazida del ácido carboxílico.

Fórmula condensada: $C_6H_7N_3O$ P.M. = 137.14

Fórmula desarrollada:



3.2. Propiedades

Descripción: Cristales incoloros o blancos, o polvo cristalino blanco inodoro que se altera lentamente por exposición al aire o la luz; sus soluciones son neutras al tornasol, y tiene un punto de fusión de 170-174°C (5, 6, 7).

Soluble en : Agua (1:8), etanol (1:45), cloroformo (1:1000), muy ligeramente soluble en éter etílico, insoluble en benceno.

El pH en solución (1:10) es de 6-7.5.

Constantes de disociación: pKa 1.8, 3.5, 10.8 (20 °C).

Potenciales de oxidación: (8)

Solución Ef

HCl 1 N	0.78
Na ₂ B ₄ O ₇	0.25
NaOH 3 N	-0.22

Residuo de ignición: No más del 0.2%.

Identificación:

La isoniácida forma complejos con muchos iones divalentes, los cuales pueden ser usados en su identificación y determinación: Cd(II), Cu(II), Co(II) y Mn(II) (8). Los reactivos que se utilizan comúnmente para su identificación son : Bromuro de cianógeno, Reactivo negro de Nessler, Bromuro de potasio (5, 6, 7).

Espectro al ultravioleta: Soluciones ácidas y alcalinas de isoniácida presentan absorción a 266 y 298 nm respectivamente.

Estándar de referencia: USP Isoniácida, secar a 105° C por 4 horas antes de su uso. Contenido: No menos del 98% y no más del 102.0% de isoniácida . Empaque y conservación en envases resistentes a la luz y herméticos (5, 6, 7).

3.3. Historia y síntesis:

La síntesis de la isoniácida fué reportada en 1921, pero no fué sino hasta 1945 que Chorine anuncia que la nicotinamida poseía una acción tuberculostática (9), se sintetizó a partir del éster metílico del ácido isonicotínico, teniendo a la isonicotinilhidrazida (isoniácida) como primer intermediario.

La isoniácida fué introducida en el mercado en 1952 como el antifímico más activo en la quimioterapia de la tuberculosis (9, 10, 11). Su síntesis se basa en el calentamiento de ácido isonicotínico o de su éster etílico con hidrazina anhídrica. A su vez el ácido isonicotínico se sintetiza mediante procesos oxidativos iniciando con la 4-metil-piridina (12).

3.4. Acción terapéutica.

La isoniácida es un fármaco antituberculoso de gran potencia, con el se observan respuestas excelentes en la tuberculosis pulmonar y meningitis tuberculosa (1).

3.5. Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de este fármaco no está bien definido. Se conoce que actúa interfiriendo en alguna fase, no determinada, del metabolismo bacteriano de la vitamina B₆ actuando como un antimetabolito por semejanza de estructura química (1).

Algunos autores refieren que la isoniácida tiene acción bacteriológica sobre la micobacteria, sobre todo en su fase de duplicación, aumentando la permeabilidad de la membrana celular. Postulan tres mecanismos de acción para este fármaco: 1) Inhibe la síntesis del ácido nicotínico, componente de la pared celular del bacilo, 2) Es agente quelante, impide la utilización de algunos metales como zinc, calcio, manganeso y cromo que son necesarios a la bacteria para sintetizar sus enzimas óxidoreductoras e 3) Inhibe la síntesis de nicotinamida (11).

3.6. Farmacocinética.

La isoniácida administrada por vía oral se absorbe totalmente en el tracto gastrointestinal y la concentración sanguínea máxima se consigue entre la 1^a y 2^a hora. Por vía intramuscular la absorción es más rápida y la concentración sanguínea terapéutica se presenta entre los 30 y 60 minutos. La concentración de fármaco desciende y desaparece completamente a las 24 horas. Una dosis diaria de 300 a 400 mg en el adulto mantiene un nivel sanguíneo medio de 2.5 mcg/ml (1).

En el organismo la isoniácida se acetila, con la formación de metabolitos no activos (1, 13, 14), de los cuales el principal es la acetilisoniácida. La isoniácida y sus metabolitos se excretan principalmente en la orina y una pequeña porción por heces, de 5 a 10 %. La vida media de este principio activo es de alrededor de 60 minutos para los acetiladores rápidos y de 160 minutos en los acetiladores lentos. Las reacciones adversas aparecen en alrededor del 5 % de los pacientes en dosis usuales. La concentración plasmática terapéutica se encuentra en un intervalo de 3 a 10 mcg/ml (1, 3, 15).

Las reacciones adversas se manifiestan por polineuritis periférica, cefalea, temblores, hiperreflexia, convulsiones, psicosis, anorexia, náuseas, constipación y fenómenos alérgicos como fiebre, dermatitis y aun acceso asmático; los cuales se han encontrado con mayor frecuencia en acetiladores lentos, dado que no se hace distinción entre los dos tipos de acetiladores aplicando la misma posología (1, 2, 3).

3.7. Dosis.

La dosis promedio es de 3 a 5 mg por kg de peso en niños y en adultos es de 150 a 300 mg por día (de 5 a 10 mg por kg de peso), (11).

3.8. Estabilidad.

Su estabilidad ha sido estudiada en solución y en varias preparaciones farmacéuticas. De particular interés en la reacción de su grupo hidrazino con aldehídos y cetonas tales como azúcares y cetoácidos, y en la complejación de isoniácida con iones metálicos.

La isoniácida es estable por varias semanas en solución amortiguadora de pH 8 (16).

La presencia de Cu(II) y Mn(II) junto con peróxido de hidrógeno aceleran la degradación de la isoniácida. Se ha establecido que la isoniácida se pierde lentamente con la oxidación en soluciones acuosas, pero en presencia de sacarosa la isoniácida reacciona con la aldohexosa formada por inversión del azúcar. Esta reacción puede ser inhibida con citrato de sodio. En condiciones anaerobias largas, la descomposición de la isoniácida en valores de pH 3 a 7 sigue una cinética de primer orden; una solución al 1.0% de este principio activo es 37 veces más estable a pH 6 que a pH 3 (8).

Estabilidad en fluidos biológicos:

Poole y Meyer (16) mencionan que la isoniácida es inestable en plasma, su descomposición puede ser retardada conservando las muestras a 5 °C. La degradación de isoniácida en muestras de suero y plasma adicionados (10 mcg/ml) que se almacenaron durante 6 meses a -10 °C, con 10000 unidades de penicilina bencilica y 500 mcg de estreptomycin por ml como conservadores, fue del 4% mensual. La degradación en muestras de suero y orina adicionadas (10 mcg/ml) almacenadas a 25 °C fué de tres cuartas partes después de una semana. Alrededor del 10.0% se

transformo en ácido isonicotínico. La degradación se vio retardada considerablemente por medio de una extracción con 1-butanol, encontrándose que después de una semana de almacenamiento la concentración de isoniácida determinada fué de un 65 y 82 % de la cantidad inicial de isoniácida sembrada en suero y orina respectivamente. La estabilidad de la isoniácida en muestras de orina y saliva se ve afectada por la contaminación bacteriana, la cual se puede prevenir por la adición de timol como conservador. Peters concluye que la isoniácida es estable en suero y en orina por un periodo de 56 días, cuando se almacena bajo congelación a -18.0°C (13). Se ha manejado la congelación a -70°C en muestras de plasma y saliva para prevenir la degradación de INH (15).

3.9. Métodos cuantitativos.

La USP XXI y XXII contienen los métodos aceptados para la cuantificación de la isoniácida en sus diferentes formas farmacéuticas (Tabletas, inyectables, etc.) en las que se encuentra sólo o concomitantemente con otros fármacos. Se basan principalmente en la separación por cromatografía líquida aprovechando la solubilidad del fármaco en diferentes solventes, y de las propiedades que tiene su molécula de absorber en el intervalo de luz ultravioleta del espectro a 263 nm; también por titulación con ácido nítrico, después de una reacción con bromuro de potasio, cuando la forma farmacéutica no requiere un tratamiento previo de separación (3, 4, 5, 6, 17).

Para estas presentaciones existen una gran gama de métodos cuantitativos para la isoniácida reportados, entre los que figuran los volumétricos (7), potenciométricos (18), por cromatografía líquida de exclusión (19), por cromatografía de líquidos de alta resolución, CLAR (15, 20, 21), por métodos fluorométricos (13, 22, 23), por espectrofotometría u.v. y visible así como microbiológicos (24, 25, 26). Los cuales varían en su especificidad, sensibilidad y exactitud.

Los métodos más sensibles y específicos son los fluorométricos y los de CLAR, con los que se puede llegar a cuantificar concentraciones hasta de 0.01 mcg/ml (22, 26, 27, 28). Sin embargo, se ha observado que en un intervalo de concentraciones de 0.2 a 10 mcg/ml los métodos que presentan mayor sensibilidad y menos variación son los colorimétricos lo cual es deseable para desarrollar un método aplicable a fluidos biológicos (13, 29).

En 1989 Prodromos B. Issopoulos y Pantelis T. Economou (29) proponen un método espectrofotométrico para la determinación de microcantidades de isoniácida, que se basa

en la reducción de Fe(III) a Fe(II) por la isoniacida y el Fe(II) resultante reacciona con la ortofenantrolina, dando lugar a la formación de un complejo quelante colorido que absorbe en el espectro de luz visible a 510 nm. El método fué lineal en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 10 mcg/ml.

4. TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad crónica con lesiones granulomatosas, de distribución mundial que puede adoptar tres formas: 1) Infección primaria, 2) tuberculosis pulmonar y 3) tuberculosis extrapulmonar (1). Es una enfermedad infecciosa y puede seguir un curso agudo o crónico dependiendo del grado de adaptación y convivencia entre el bacilo de Koch y el hombre. Se caracteriza porque su ciclo epidemiológico se desarrolla en periodos muy largos, dado que el desarrollo de la enfermedad y de la inmunidad están muy relacionados con las condiciones de vida de la población. Por lo que es una enfermedad que afecta de preferencia a las poblaciones pobres.

Dada la forma de contagio, por vías respiratorias, el control está enfocado a la inmunización específica de los expuestos, al tratamiento de los casos infectantes y/o a retardar la infección. Por lo que el planteamiento y conducción de los programas de control deben estar relacionados con el nivel de vida y con la fase epidemiológica de la enfermedad en la población. En los países en vías de desarrollo existen muchos factores, entre ellos los económicos, que hacen imposible centrar los objetivos de dichas acciones en el aislamiento de los focos de infección (1).

La morbilidad en el Continente Americano hasta 1967 fué particularmente alta en América del Sur, considerable en México y Centroamérica, descendiendo de manera marcada en América del Norte (2). La morbilidad hasta el mismo año parece descender en toda América por la implementación de terapias con antibióticos y quimioterapéuticos. Sin embargo, para 1989 con el uso moderno de la informática, en América del Norte se observó un aumento en la mortalidad debida a la tuberculosis cuando además de certificados de defunción se utilizaron otras fuentes de información (30): Encontrándose esta enfermedad entre las catorce principales causantes de defunciones en este país, creando por su extensión y consecuencias un problema social grave.

4.1. Agente etiológico: El Mycobacterium tuberculosis es el agente etiológico de la tuberculosis y se ha comprobado que el bacilo de tipo humano es el que causa casi todos los casos de tuberculosis pulmonar; el tipo bovino causa una gran parte de tuberculosis extrapulmonar, variando las proporciones según la oportunidad de infección.

4.2. Reservorio y fuente de infección: El reservorio es el hombre principalmente y, en algunas zonas es el ganado enfermo. La fuente de infección son las secreciones del aparato respiratorio de las personas con tuberculosis pulmonar " abierta " (baciloscopia positiva) y leche de vacas tuberculosas.

4.3. Modo de transmisión: La tos o el estornudo de enfermos con tuberculosis pulmonar " abierta " forma un aerosol de materia infecciosa: Las diminutas partículas pueden ser inhaladas directamente o después de asentadas y resuspendidas junto con el polvo. El contacto directo o indirecto son modos importantes de infección, la infección causada por los alimentos debida a la contaminación de los cubiertos y vajillas es menor.

4.4. Sintomatología: Por lo general la tuberculosis primaria o primoinfección pasa inadvertida, aunque en ocasiones puede haber fiebre, síntomas constitucionales vagos o comprobación (mediante exámen de rayos x) de un filtrado en los pulmones y de crecimiento de los ganglios linfáticos traqueobronquiales. Las lesiones curan espontáneamente dejando sensibilidad a la tuberculina. En los adultos jóvenes puede dar lugar a tuberculosis pulmonar, la cual tiene una evolución crónica y variable, pero es capaz de incurrir en cualquier estadio. Los síntomas son: Tos, fatiga, fiebre, pérdida de peso, irritación de la garganta y dolor torácico. La tuberculosis extrapulmonar es rara y se presenta cuando el bacilo invade otros órganos.

4.5. Tratamiento: Hoy día la tuberculosis es prevenible y curable gracias a la disposición de agentes terapéuticos eficaces. Recomendándose un régimen de seis meses: Terapia combinada los dos primeros meses (isoniacida, rifampicina y pirazinamida), seguida de terapia consolidada (isoniacida y rifampicina), durante los siguientes cuatro meses.

Los tratamientos antituberculosos en México son recomendados por la Secretaria de Salud y son:

- 1) Tratamiento primario autoadministrado (12 meses), y
- 2) Tratamiento primario de corta duración, supervisado (hasta 7 meses de duración) (30, 31, 32).

Un problema que se presenta durante el tratamiento es que puede surgir resistencia rápidamente y es función de la magnitud de la población bacteriana presente en la lesión. Esta resistencia es significativa si hay un foco de infección persistente, pero no lo es tanto si la enfermedad es mínima. La adición de un segundo o tercer antituberculoso retarda el comienzo de la resistencia.

4.6. La Isoniacida como el antituberculoso primario: La isoniacida es un quimioterapéutico de acción bactericida, el cual por ser un principio activo de primera línea es considerado como el antituberculoso primario, por su mayor actividad y menor toxicidad, es el más potente y de acción específica. Usado concomitantemente con otros antibióticos evita que los microorganismos patógenos generen resistencia (30, 31).

5. GENERALIDADES DE LA MUESTRA SALIVA

5.1. Constitución: La saliva es una solución acuosa constituida por varias sustancias de alto y bajo peso molecular, consta de dos tipos de secreción: 1) Una fracción serosa que contiene ptialina y 2) una fracción mucosa encargada de la lubricación. Las principales glándulas salivales son las parótidas, submaxilares y sublinguales.

La saliva está constituida por mucina, nitrógeno proteico y no proteico, glucosa, citrato, colesterol, sodio, potasio, calcio, fosfatos orgánicos, cloro y otros. También contiene iones de tiocianato, varias enzimas proteolíticas y anticuerpos. La tabla que se muestra a continuación proporciona algunos de los componentes de la saliva mixta y parótida, que son las fracciones de mayor utilidad en la predicción de los niveles plasmáticos de fármacos. Los electrolitos, las proteínas y los solutos acuosos son los productos de secreción más importantes, independientemente del sitio de producción (33).

TABLA.-CARACTERÍSTICAS Y CONSTITUYENTES DE LA SALIVA HUMANA.

pH	6.7 (5, 6-7.6)
Densidad	1.01 - 1.02
Disminución del punto de congelación	0.34 - 0.70
Secreción en reposo, ml/min.	0.6 (0.1-1.8)
Contenido de humedad, g/dl	0.2
Mucina, mg/dl	270 (100-600)
Nitrógeno total, mg/dl	90 (40-125)
Nitrógeno no proteico, mg/dl	39 (10-60)
Glucosa, mg/dl	20 (1228)
Citrato, mg/dl	1.0 (0.2-3)
Colesterol, mg/dl	8 (3-15)
Sodio, mg/dl	40 (15-55)
Potasio, mg/dl	55 (45-60)

Continuación:	
Calcio, mg/dl	6 (4-10)
Fosfato inorgánico, mg/dl	15 (7-20)
Fosfato total, mg/dl	19
Cloro, mg/dl	60 (40-70)

La concentración de proteínas totales en la saliva depende de la secreción obtenida por el tipo de estímulo (químico o mecánico), el método de colección (directo o con artefactos), y el método de determinación (Biuret, Lowry, etc.).

La saliva total es una mezcla de la secreción de las glándulas mayores y menores, mas una pequeña cantidad de flujo crevicular gingival. El fluido crevicular es un exudado que contiene albúmina en una concentración igual a la de plasma. Las diferentes fracciones de las glándulas salivales presentan variaciones cualitativas y cuantitativas de proteínas. Las secreciones sublinguales, submaxilares y mixtas son turbias y viscosas, con una considerable cantidad de proteínas y sólidos suspendidos. La saliva de la parótida es menos viscosa y tiene poca materia insoluble. Si la saliva se recolecta directamente del ducto de Stensen, se evita la mezcla con el resto de secreciones orales y con el fluido crevicular (34).

5.2. pH: El pH, el flujo salival y el contenido de fosfato inorgánico, tienen un ritmo diario que se relaciona con la temperatura de la boca, siendo mínimo en la mañana (6 a.m.) y un máximo en la tarde (6 p.m.). El pH tiende a ser neutro. La secreción de las glándulas submaxilares y parótidas sin estimular, dan valores de pH ligeramente ácidos (35).

5.3. Volumen de saliva y cambios fisiológicos: Se ha establecido a menudo que la producción de saliva diaria es de 1 a 1.5 litros, pero una estimación más real es de 500 a 600 ml. Existen diferentes valores reportados de la contribución de las glándulas salivales a la secreción total. La glándula submaxilar con un 71 % en estado de reposo, la parótida secreta 66 % con estimulación por comida, las glándulas salivales menores contribuyen aproximadamente de 7 a 8 %. De los factores que influyen la secreción de saliva y que puede afectar la composición de la saliva se incluyen, además de la ingestión de alimento, el ritmo circadiano, el efecto de la luz, la edad, el sexo, la actividad física (33).

5.4. Métodos de obtención de la muestra: Las glándulas salivales están controladas por señales nerviosas parasimpáticas de los núcleos salivadores. Estos núcleos se encuentran en el límite del bulbo y protuberancia, y son activados por impulsos táctiles en la lengua u otras partes de la boca. La mayor parte de estímulos gustativos, especialmente de sabor ácido desencadenan secreciones abundantes, frecuentemente de 5 a 10 ml por minuto. Ciertos estímulos táctiles, como la presencia en la boca de objetos lisos provocan salivación copiosa, mientras que objetos ásperos producen menos saliva. El mecanismo de sujetar entre los maxilares un objeto tiene también un efecto similar. Los procedimientos para la obtención de muestras de saliva se pueden clasificar de manera general en dos: 1) Salivación estimulada y 2) salivación no estimulada. En el primer procedimiento se utiliza alguna sustancia química u objeto que desencadene una salivación copiosa como son: La aplicación de ácido cítrico al 10 % cada 30 segundos en el dorso de la lengua, algunos autores han utilizado la aplicación de sólo una o dos gotas del mismo, otros administran una solución de ácido acético al 1 % aplicado con esponjas. Por masticación de diversos objetos : Goma sintética, teflón, papel encenrado, piedras estériles, etc. (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44). El uso de saliva estimulada puede introducir interferencias en el método cuantitativo, ocasionadas ya sea por la sustancia utilizada o por la obtención de muestras sucias debido a la descamación del epitelio; además de que como se estimulan otras glándulas varía la cantidad de proteínas presentes en cada toma de muestra. Por lo que se prefiere el uso de muestras de saliva no estimulada, la cual se obtiene dejandola fluir libremente por los bordes de los labios hacia un tubo de ensayo limpio, la cabeza debe estar en posición vertical con respecto al suelo. La salivación se puede aumentar moviendo rítmicamente los carrillos y la lengua.

Para la obtención de la saliva secretada por cada una de las glándulas existen métodos específicos (45).

6. PROCEDIMIENTOS INVASIVOS Y NO INVASIVOS EMPLEADOS EN EL SEGUIMIENTO DE NIVELES DE FÁRMACOS

A) Procedimientos invasivos.

De los fluidos corporales, el suero o el plasma han sido los medios de ensayo para fármacos más frecuentemente empleados. Debido a su distribución a través de todos los órganos y tejidos del organismo, se considera a menudo que existe un equilibrio de los fármacos entre estos fluidos y la biofase (32). Las muestras pueden obtenerse por venipunción. Cuando se desean muestras de volumen pequeño es suficiente el extraído por punción de las yemas de los dedos. Cuando se desea obtener un gran número de muestras, durante un intervalo de dosificación en particular, con el fin de aumentar la exactitud y optimizar el perfil de concentración para su aplicación clínica, se tiene muchos problemas de tipo práctico y ético con esta técnica. Con pacientes externos o ambulantes, el muestreo esta restringido a una o dos tomas por sesión. Es necesario que se realice bajo una supervisión cuidadosa, así como contar con condiciones experimentales adecuadas. En niños se pueden obtener muestras entre 0.3 y 1 ml de sangre ya sea de los talones, las manos o el cuero cabelludo (32). Este procedimiento está asociado, como se observa, con algún grado de riesgo físico ya sea durante la venipunción o colocación del catéter, lo cual puede dar lugar a la formación de hematomas, infección, dolor y, en algunas ocasiones a un síndrome interóseo interior. Aunque algunas personas consideraran que el dolor es trivial, muchos sujetos no desean participar en estudios por el hecho de tomar las muestras por procedimientos invasivos.

Graham, describió alguna evidencia de "trauma psicológico", en un estudio realizado con 414 donadores de sangre, donde aproximadamente el 15.2 % de los sujetos experimento desmayos o alguna sensación de éste. Algunos sufrían reacciones vasovagales al tratar de colocarles los catéteres, con lo cual no se permitía la extracción de la muestra y se tenían que excluir del estudio (43).

B) Procedimientos no invasivos.

Saliva, orina, sudor y lágrimas son otros fluidos que pueden muestrearse, de los cuales sólo orina y saliva se emplean en forma rutinaria.

La saliva es particularmente útil para el seguimiento de fármacos en pacientes sometidos a terapia crónica y sobre

todo en los estudios de farmacocinética en la población pediátrica debido a la necesidad de muestras múltiples seriadas, resolviéndose con este procedimiento problemas tanto de tipo práctico como ético. Se cuenta, además, con la ventaja de que su recolección puede realizarse con personal no adiestrado, en los tiempos marcados en los protocolos y con la comodidad de hacerlo incluso en la casa del paciente.

6.1. Concentración de fármacos en saliva.

Se ha informado de concentraciones proporcionales de fármacos en saliva y plasma, ya sean estas últimas totales, como es el caso de los salicilatos, digoxina, o libres como en la difenilhidantoína e isoniacida (15, 42, 43, 46).

La mayor parte de investigaciones se han realizado midiendo la concentración total de fármaco en plasma. Esto se respalda por el hecho de que en muchas situaciones terapéuticas, las concentraciones de fármaco libre son un porcentaje constante del total. Pero cuando existen condiciones patológicas que provocan ya sea hipoalbuminemia, cambios en la capacidad enlazante de la albúmina como en la uremia o un desplazamiento de fármacos de las proteínas plasmáticas por tratamiento concomitante, la fracción libre puede aumentar, por lo que la concentración plasmática total deja de ser representativa de la existente en los sitios de acción, asociándose con toxicidad que puede ser muy grave. En tales situaciones puede ser preferible basar las decisiones terapéuticas en las concentraciones séricas de fármaco libre.

El uso alternativo de concentraciones de fármaco en saliva o líquido cerebroespinal es lógico, ya que estos fluidos representan "ultrafiltrados naturales" del plasma, equivalentes a los obtenidos por técnicas in vitro como la ultrafiltración, diálisis al equilibrio, etc., las cuales son muy costosas y consumen mucho tiempo.

El entendimiento de la secreción de fármacos en la saliva permite analizar sus alcances y limitaciones dentro del seguimiento de fármacos (80).

6.2. Factores que afectan la relación de la concentración de fármacos (saliva/plasma).

Como ya se ha mencionado, la presencia de varios fármacos en saliva se ha establecido en la práctica clínica después de una dosis terapéutica normal. La relación entre la concentración de un fármaco en saliva y plasma depende del tamaño molecular, la solubilidad en lípidos, el grado de

enlazamiento a proteínas plasmáticas, la ionización dependiente del pH de ambos fluidos y el flujo salival (47).

Aunque los principios que determinan la distribución de los fármacos a través de las membranas empleando diferente pH es muy conocido, la importancia de su estudio sigue vigente (48).

Killman y ad. (49), empleando series homólogas de sulfonamidas, así como Martin y ad. (50), con tolbutamida, mostraron que el cociente concentración de fármaco (saliva/plasma), está de acuerdo con el predicho por la fórmula:

$$R = \frac{1 + 10^{(pH_s - pK_a)} \times f_p}{1 + 10^{(pH_p - pK_a)} \times f_s}$$

donde R = cociente de la concentración del fármaco (saliva/plasma).

pH_s = pH de la saliva
 pH_p = pH del plasma
 pK_a = pK_a del fármaco
 f_p = fracción libre del fármaco en plasma
 f_s = fracción libre del fármaco en saliva.

Empleando este principio para una selección de fármacos ácidos y básicos, Mucklow y ad. demuestra a partir de una predicción confiable de las concentraciones plasmáticas a partir de las salivales para aquellos compuestos que no estén ionizados al pH plasmático (fenilhidantoína, fenobarbital y antipirina), pero no confiable en el caso de fármacos que se ionizan como la clorpropamida, la tolbutamida, el propranolol y la meperidina (38).

Una característica esencial para el uso de saliva en el seguimiento de fármacos es que su concentración debe ser independiente del flujo salival. Debido a modificaciones en la velocidad de flujo salival, se puede alterar el pH de la saliva, provocando una gran variabilidad inter e intrasujeto de la concentración de los fármacos en este fluido, sobre todo de compuestos ionizables (51).

Para fármacos ácidos o básicos muy débiles no es importante este factor ya que su comportamiento es similar a los neutros, pero si lo es para aquellos con características ácidas (con un pK_a menor de 7), o básicas (con un pK_a mayor de 5.5). Cuando se aumenta deliberadamente la velocidad de flujo salival y como consecuencia el pH, en un estudio se demostró que para los fármacos como la meperidina y la tolbutamida que se ionizan a pH fisiológico, la relación de concentración de fármaco saliva/plasma se modifica, disminuyendo en el primer caso y aumentando en el segundo, por un factor de dos (38).

6.3. Precaución en la interpretación de los niveles salivales de fármacos.

Se ha descrito retención de antipirina en la mucosa bucal después de su administración; para evitarla es necesario que el paciente se enjuague la boca entre cada toma de muestra. Si se descuida este aspecto la relación de fármaco en saliva y plasma sólo es proporcional transcurrido un determinado tiempo postadministración (51).

Para decidir sobre cuál fracción emplear, debe considerarse la presencia de proteínas en el fluido. Anavekar (34), en un estudio de difenilhidantoina, al comparar las concentraciones obtenidas antes y después de centrifugar la saliva total, demostró que la concentración del fármaco en el sobrenadante era baja debido al enlace de éste al sedimento mucoso (constituido de grandes cantidades de mucoproteínas, células bacterianas y desechos de células epiteliales); además, cuando se compararon las concentraciones de fármaco tomadas de las diversas glándulas, con respecto a la obtenida por ultrafiltración del suero, los valores más próximos fueron los de las parótidas.

Es necesario investigar la naturaleza del enlace de los fármacos a las proteínas salivales, el fluido crevicular y la influencia que las enfermedades bucales pueden tener sobre la composición de este fluido.

Por otro lado, los intervalos terapéuticos establecidos cuando se emplea plasma total, pueden diferir en el caso de saliva. Para la carbamacepina se informa un intervalo terapéutico en plasma de 4 a 12 mcg/ml y en saliva de 1.1 a 3.2 mcg/ml, como fármaco libre (52).

En muchas ocasiones, aunque los fármacos no se ionizan al pH fisiológico, no se obtiene correlación de los niveles de fármacos en saliva y plasma, sobre todo en terapia múltiple. Lowne y Dixon (53), observaron que al aumentar la dosis de prednisolona, aumentaba el volumen de distribución y disminuía la depuración, posiblemente debido a la saturación de las proteínas plasamáticas y la consecuente elevación de la fracción libre; sin embargo, no pudieron explicar el por qué del aumento del tiempo de vida media, con la dosis, lo cual puede ser indicativo de la saturación de algún mecanismo de transporte activo que media entre las glándulas salivales y la irrigación sanguínea local.

Van Der Graaff y ad. (41), debido al interés de emplear al hexobarbital como un marcador metabólico, demostraron que la depuración plasmática, no puede determinarse sólo con datos salivales. La razón es la discrepancia entre los porcentajes de fármaco enlazado calculados a partir del

cociente de concentración saliva/plasma y diálisis al equilibrio, con lo que la relación de áreas (ABC) de estos fluidos es inaceptable, aún a pesar de que el valor de tiempo de vida media es consistente en ambos fluidos.

Schroder y ad. (37), describen el uso de concentraciones de metotrexato en saliva para su seguimiento. El metotrexato es un fármaco que se emplea en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda, se administra por infusión intravenosa durante 24 hrs y usualmente a una dosis de 0.5 a 1 g. El seguimiento es necesario ya que las concentraciones permitidas en suero deben ser menores de 10 nmol para evitar síntomas de toxicidad, entre ellos la supresión de la médula osea, por lo que el uso de los niveles salivales de fármacos es deseable. Sin embargo, no se encontro ninguna correlación estable para las concentraciones de fármaco en saliva y sangre, observándose un aumento significativo del valor de esta relación con el tiempo de infusión (20 y 44 hrs). Una posible explicación, nuevamente, es su ionización al pH fisiológico, ya que se trata de un ácido dicarboxílico débil y su eliminación depende del pH de la saliva. No se investigó el enlace a albúmina. El intervalo informado va de 46 a 95 %, representando otra posible fuente de variabilidad.

Para el manejo terapéutico del paciente, no sólo es necesario la determinación de las concentraciones plasmáticas, obedeciendo un protocolo de muestreo diseñado para conseguir máxima información, sino que además es importante la interpretación de los datos de farmacocinética clínica citados en la literatura y de los obtenidos del paciente en el laboratorio, bajo una visión integral de la fisiopatología, la farmacología y toxicología propias del fármaco, así como la identificación de las sustancias que pueden interferir en el efecto terapéutico y en el procedimiento analítico.

7. GENERALIDADES DE VALIDACIÓN (59, 60, 61, 62)

7.1. Definición:

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos que proporcionan una medida del comportamiento del método, y comprende una serie de pruebas sistemáticas, las cuales permiten establecer estos parámetros de manera clara y objetiva. Por lo que el proceso de validación de un método particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. La evaluación de estos parámetros permite conocer la confiabilidad del método analítico para ser usado.

El proceso de validación es en sí una parte integral del desarrollo de cualquier método analítico, donde se prueba la efectividad del mismo.

7.2. Necesidad de la validación:

Uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica, alimenticia y química actual es asegurar el control de calidad tanto de la materia prima como del producto en proceso y terminado. Por eso es de interés la validación de métodos analíticos debido al incremento de nuevos productos que requieren de métodos de análisis apropiados. Es por esto que la validación retrospectiva y prospectiva ha tomado gran importancia en estas áreas.

En la industria farmacéutica la validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis del control de calidad de una forma farmacéutica.

La validación de los métodos analíticos es también de particular importancia en la investigación clínica. Los estudios biofarmacéuticos ó farmacocinéticos de los medicamentos requieren del desarrollo y validación de métodos analíticos efectivos, ya que estos son una de las principales fuentes de variación que no ha permitido poner en claro la utilidad del monitoreo de fármacos en muchos casos. En la actualidad se ha progresado mucho en esta área con la introducción de conceptos tan importantes como la validación, con la cual la información empieza a uniformarse

permitiendo la comparación de datos en experimentación clínica.

7.3. Linealidad:

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o mediante una transformación matemática, son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado de concentraciones. Es decir, mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $y=mx + b$ al trabajar a diferentes concentraciones.

7.3.1. Linealidad del sistema:

La relación entre la cantidad de principio activo adicionada y la respuesta obtenida debe dar una función lineal.

Se determina mediante la construcción de una curva de calibración (concentración vs respuesta) utilizando por lo menos cinco concentraciones, cubriendo un intervalo de interés, preparadas por dilución a partir de la misma solución patrón, haciendo el análisis por triplicado para cada concentración. Registrando y tabulando la respuesta para cada ensayo. Realizando la curva dos días diferentes .

Cálculos: Pendiente (m).
Intercepto (b).
Coeficiente de determinación (r^2).
Coeficiente de regresión (r).

Criterio: $r^2 > 0.98$
 $r > 0.99$

7.3.2. Linealidad del método:

La relación entre cantidades adicionadas y cantidades recuperadas de principio activo empleando el método analítico propuesto debe ser lineal.

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos cinco concentraciones diferentes, cubriendo un intervalo de interés, cada uno preparado de forma independiente, haciendo el análisis por triplicado para cada concentración. Realizar la curva dos días diferentes.

Cálculos: Trazar una gráfica de cantidad adicionada contra cantidad recuperada.
 Pendiente (m).
 Intercepto.
 Error estándar de regresión.
 Coeficiente de determinación.
 Coeficiente de regresión.

Criterio: $r^2 > 0.98$
 $r > 0.99$

7.4. Precisión:

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia de un conjunto de valores experimentales respecto al valor promedio. Se clasifica en repetibilidad y reproducibilidad. Se determina analizando al menos seis muestras de una concentración (generalmente la concentración considerada como el 100 %) en tres diferentes días. Se registra y se calcula la respuesta obtenida en porciento de la cantidad recuperada.

Cálculos: Calcular la media.
 Calcular la desviación estándar.
 Calcular el coeficiente de variación (c.v.).

Criterio: El c.v. en % debe de ser de acuerdo a el método:

-Cromatográfico	2 %
-Químico y Espectrofotométrico	3 %
-Microbiológico	5 %
-Fluidos biológicos	10 %

7.4.1. Exactitud:

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes con respecto a un valor real, bajo las mismas condiciones (analista, equipo, tiempo, etc.). Se determina analizando al menos seis muestras para una concentración (al 100 %), un analista, en un mismo día.

Cálculos y Criterio: Los mismos que para precisión.

7.5. Límite de detección:

Es la mínima concentración de principio activo que puede dar una respuesta atribuible a él, pero no

cuantificada, bajo condiciones normales de operación. La respuesta debe estar dos veces por encima del nivel del ruido del sistema. Se determina mediante diluciones seriadas de la sustancia patrón de referencia, hasta obtener una respuesta de dos veces por encima del nivel de ruido del sistema.

Cálculos: Se determina por medio de un modelo estadístico.

Criterio: La señal obtenida debe ser dos veces mayor que el ruido del sistema.

7.6. Límite de cuantificación:

Es la mínima concentración de principio activo que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo condiciones normales de operación. Se determina analizando muestras de concentración conocida y estableciendo el nivel mínimo de detección con exactitud y precisión.

Cálculos: Se determina por medio de un modelo estadístico.

Criterio: El mismo que para precisión.

8. FUNDAMENTO DEL TEMA EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA

Es bien conocida la dependencia genética de la acetilación de principios activos en el organismo humano. En la acetilación de la isoniacida el carácter acetilador se transmite por medio de un gene simple autosómico hereditario, lo cual produce tres subpoblaciones representativas: Los homocigótos rápidos, heterocigótos rápidos y homocigótos lentos. Pero como la segunda forma es difícilmente detectable la población se divide generalmente en acetiladores rápidos (que presentan un nivel sanguíneo de 0.5 a 2.5 mcg/ml seis horas después de una dosis de 10 mg de isoniacida/Kg de peso) y en acetiladores lentos (en los que el nivel es de 3 a 6 mcg/ml con la misma dosis), según la velocidad de inactivación de la isoniacida en el organismo, la cual depende de la enzima transacetilasa sintetaza (1, 13, 15, 19, 58, 59, 60).

El carácter de acetilador lento se transmite como autosómico recesivo, y aunque las proporciones entre estos dos fenotipos varía extensamente en las diferentes partes del mundo (19, 58), en promedio la proporción es de un 50 % entre la población (60). Se ha encontrado en estudios recientes que el grado de mala nutrición, sobre todo en niños, disminuye la capacidad acetiladora (58). Esta característica probablemente afecta la respuesta terapéutica.

La determinación del fenotipo acetilador es clínicamente importante por tres razones: 1) Por que el grado de susceptibilidad a la hepátotoxicidad de la isoniacida es mayor en los acetiladores lentos, aunado a el grado de malnutrición; 2) el establecimiento de un régimen efectivo depende del tiempo de vida media de la INH en el individuo, el cual está determinado por el tipo acetilador, y 3) para el establecimiento de una dosis óptima en la terapia de niños malnutridos. Otras razones son la evidencia del desarrollo de pelagra en algunos pacientes y el aumento en el riesgo de desarrollo de lupus eritematoso inducido por el fármaco en acetiladores lentos.

Para lograr la determinación del fenotipo acetilador se necesita del desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de isoniacida en fluidos biológicos, los cuales se caractericen por su sensibilidad, sencillez, bajo costo y confiabilidad, para ser empleados con fines terapéuticos en la diferenciación entre estos dos fenotipos en la población afectada; factibles de realizarse en laboratorios con reactivos y equipo de uso común como son los de los hospitales de atención primaria y centros de investigación. Los métodos que reúnen estas características son los espectrofotométricos, dado que actualmente un espectrofotómetro forma parte del equipo fundamental de cualquier laboratorio.

La confiabilidad de estos métodos debe ser probada sometendolos a un proceso de validación, con el cual se reúna un conjunto de datos suficientes que permitan demostrar con una confianza razonable que el método estudiado realiza y realizará aquello que tiene como fin, por medio de una evidencia documentada, comprobando que el proceso se desarrollará tal como fué previsto.

Se han implementado métodos espectrofotométricos para la determinación de isoniacida en suero y orina. Sin embargo, los métodos desarrollados para la cuantificación de este principio activo en muestras de saliva no poseen las características antes citadas (15, 23). El principal objetivo del presente trabajo de tesis es desarrollar y validar un método espectrofotométrico que permita la cuantificación de los niveles de isoniacida en saliva de manera confiable, sencilla y de bajo costo. Este permitirá r utilizar una técnica no invasiva en la toma de muestra, siendo de particular utilidad a nivel pediátrico y geriátrico, ya que no causa traumatismo.

9. PARTE EXPERIMENTAL

ambar en lugar fresco y obscuro, con la fecha de preparación.

2.Solución STOCK de isoniácida, INH STK, de 1000 mcg/ml. Pesar exactamente en balanza analítica 50 mg de isoniácida patrón y disolver en agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2. Transferir a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar al volúmen con agua desionizada del mismo pH. Colocar para su conservación en frasco de color ámbar y refrigerar a 4° C. Esta solución se debe preparar para cada día de trabajo.

3.Solución ESTANDAR de isoniácida , INH STD, de 360 mcg/ml.Tomar de la solución INH STK 9 ml con pipetas volumétricas de 5 y 4 ml y colocar en matraz volumétrico de 25 ml, llevando al volúmen con agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2.

9.1. ETAPA DE DESARROLLO

9.1.1. Procedimientos básicos.

En la adaptación del método analítico para la cuantificación de microcantidades de isoniacida descrito por Prodromos (29) a muestras de saliva se adoptaron dos procedimientos básicos (Diagrama de Flujo 1). En el primero la limpieza de la muestra se realiza mediante el uso de agentes precipitantes de proteínas aplicando seguidamente el método analítico. En el segundo procedimiento se extrae a la isoniacida con solventes de mediana polaridad y con el uso de una sal que produzca el efecto salting out reextrayendola finalmente con ácido clorhídrico 0.1 N. Estos procedimientos básicos fueron propuestos después del análisis bibliográfico adecuado sobre las propiedades físicas y químicas de la isoniacida, las características de la muestra y los métodos propuestos para la cuantificación de este principio activo mediante extracción con solventes. La elección de uno de ellos dependió del porcentaje de recobro de isoniacida que se obtuvo en la muestra adicionada.

9.1.2. Factores que influyen en el método de elección.

En la estandarización del método de elección, que es por extracción con solventes, se estudio el efecto que ejercen parámetros experimentales como: Volumen de agente complejante, agente que produce el efecto salting out, tipo de solventes, proporción de una mezcla de solventes de extracción, etc., con el objeto de establecer sus valores óptimos.

9.1.3. Influencia del agua destilada y desionizada en el desarrollo de la reacción de color.

Para determinar la influencia del tipo de agua en el desarrollo de la reacción de color se realizaron ensayos por triplicado de isoniacida tanto en agua destilada como en desionizada, manejando tres concentraciones 0.8, 6.0 y 10.0 mcg/ml, (Tabla 2).

9.1.4. Efecto del volumen de agente complejante (A. C.).

En la determinación del volumen apropiado de agente complejante se construyeron tres curvas de calibración de isoniácida en agua desionizada de concentraciones 2, 4, 6, 8 y 10 mcg/ml (Tabla 3), a partir del Sistema primario de INH/agua desionizada (Apéndice 2); a las que se les adicionó 200, 400 y 500 mcl respectivamente de agente complejante en el desarrollo de la reacción de color (Figura 1, Apéndice 1).

9.1.5. Efecto del solvente en la extracción.

En la selección del solvente adecuado para la extracción de isoniácida en muestras de saliva adicionada se probaron los siguientes: Alcohol isoamílico:éter etílico 85:15 (A), butanol (B) (Tabla 4) y butanol:cloroformo 90:10 (E) (Tabla 8); siguiendo el procedimiento básico en muestras de 6 mcg/ml de concentración.

9.1.6. Efecto del agente que produce el efecto salting out en la extracción.

En la extracción de la isoniácida con butanol se probaron dos combinaciones de sales para producir el efecto salting out: Acetato de sodio 4 M más sulfato de amonio (1 ml, 15 % p/v) y 3 g de sulfato de amonio; siguiendo el procedimiento básico en muestras de saliva adicionada con INH de concentración 6 mcg/ml (Tablas 4 y 5).

9.1.7. Efecto del tipo y tiempo de agitación en la extracción.

Para la determinación del mejor tipo y tiempo de agitación en la reextracción se realizaron ensayos por quintuplicado utilizando dos minutos de agitación en vortex a la velocidad No. 7, y veinte minutos de agitación mecánica. Trabajando muestras de saliva adicionada con isoniácida de concentración 6 mcg/ml y butanol como solvente (Tablas 4 y 5).

9.1.8. Efecto del pH.

Para poder determinar el efecto de la variación en el pH en la extracción de isoniácida de muestras en el sistema butanol/agua se probaron los siguientes pHs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, aplicando el procedimiento básico en muestras de isoniácida en agua desionizada de concentración 6 mcg/ml ajustando el pH a cada uno de los anteriores. Esto se realizó con el propósito de determinar el pH óptimo de extracción en las muestras, es decir el pH en el cual se obtiene el mayor porcentaje de recobro posible (Tabla 6, Figura 2). Este factor también se determinó en el sistema butanol:cloroformo 60:40/saliva adicionada (6 mcg/ml de INH) en los pHs 5 a 9, realizando tres ensayos para cada valor de pH (Tabla 11, Figura 4).

9.1.9. Ensayo previo pH 7, efecto del sistema.

Con el objeto de probar el pH de extracción óptimo determinado (pH 7) se realizaron ensayos por sextuplicado y triplicado en tres diferentes sistemas: Butanol/saliva adicionada más agentes precipitantes de proteínas (D) (Tabla 7), butanol/saliva adicionada más sulfato de amonio (C) y butanol:cloroformo 90:10/saliva adicionada más sulfato de amonio (E) (Tabla 8); trabajando todos los ensayos a una concentración de 6 mcg/ml. Tomando como tiempo estándar de agitación mecánica en la reextracción 30 minutos y el sulfato de amonio como el agente adecuado para producir el efecto salting out deseado.

9.1.10. Efecto de la proporción de solventes en la mezcla seleccionada para la extracción de isoniácida en saliva.

Una vez establecido que la mejor mezcla de solventes para la extracción de isoniácida en saliva es butanol:cloroformo 90:10 (ver Tabla 8) se determinó la proporción óptima de esta mezcla de solventes de la siguiente manera: Se prepararon las proporciones butanol:cloroformo 100:0 a 0:100 y se realizaron ensayos por quintuplicado para cada proporción en muestras de saliva adicionada de concentración 6 mcg/ml de INH, siguiendo el procedimiento básico, (Tabla 9, Figura 3).

9.1.11. Influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica.

Para poder determinar los grados de inclinación de la muestra adecuados en la reextracción, se realizaron catorce ensayos de muestras de saliva adicionada (6 mcg/ml de INH) manejando dos grados de inclinación 45° y 20° . Se manejaron dos blancos en cada caso para establecer si existe diferencias en la extracción, leyendo contra cada uno de ellos (Tablas 13 y 14).

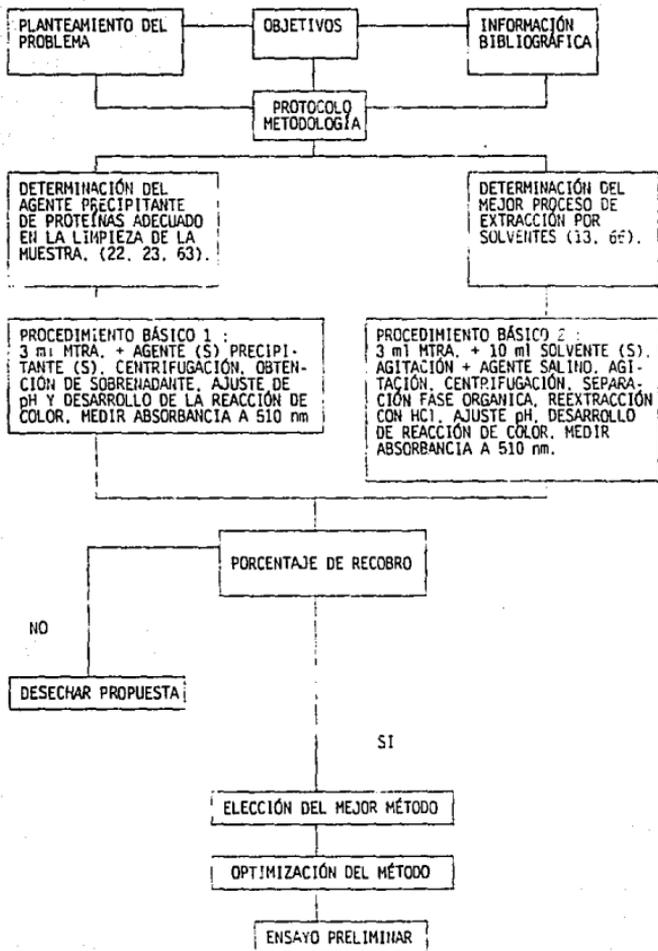
9.1.12. Influencia del volumen de la mezcla de solventes butanol:cloroformo y la cantidad de sulfato de amonio en la extracción de isoniacida de la muestra.

Esta influencia se determinó mediante la aplicación de cuatro diferentes tratamientos en los que se manejan condiciones combinadas al azar (2 volúmenes y 2 cantidades de sulfato de amonio), para cada tratamiento se realizaron ensayos por triplicado a muestras de saliva adicionada (6 mcg/ml de INH) (Tabla 16).

9.1.13. Ensayo preliminar del método desarrollado para la cuantificación de isoniacida en saliva.

Después de establecer los parámetros experimentales óptimos para la cuantificación de isoniacida en saliva se procedió a realizar ensayos preliminares durante dos días, los cuales consistieron en la construcción de curvas de calibración de placebos añadidos de isoniacida en saliva de concentraciones 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6, y 14.4 mcg/ml. Preparadas a partir del Sistema base de INH/agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2 (Apéndice 2) por dilución en saliva a pH 7.5. Aplicando el método a cada concentración por triplicado, (Tabla 18, Figura 5).

DIAGRAMA DE FLUJO 1
DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO DE INH EN SALIVA



9.2. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN.

Los parámetros a evaluar dentro del protocolo de validación se esquematizan en el Diagrama de Flujo 2.

9.2.1. Linealidad del sistema.

A partir del Sistema primario de INH/agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2 (Apéndice 2) construir la Curva de calibración de INH/agua desionizada a concentraciones de 0.8, 1.6, 2.0, 3.2, 4.0, 6.0, 8.0 y 10 mcg/ml, incluyendo la concentración considerada como el 100 % (6 mcg/ml), y desarrollar la reacción de color. Leer la absorbancia a 510 nm ajustando el espectrofotómetro con el blanco correspondiente. Realizar la curva de calibración por triplicado en dos días diferentes.

9.2.2. Precisión del sistema.

Determinar la precisión del sistema realizando el ensayo por sextuplicado a la concentración de 6 mcg/ml (considerada como el 100 %), utilizando la misma solución estándar de la linealidad del sistema. Realizar el análisis en los dos días indicados para la linealidad del sistema.

9.2.3. Linealidad del método.

Elaborar una Curva de calibración de placebos añadidos de INH/Saliva a partir de la Curva de calibración primaria de placebos añadidos de INH/SALIVA (Apéndice 2) de concentraciones 2, 4, 6, 8 y 10 mcg/ml, incluyendo la concentración considerada como el 100 % (6 mcg/ml), aplicando el método modificado para la cuantificación de isoniacida en saliva, desarrollando finalmente la reacción de color. Leer la absorbancia a 510 nm ajustando el aparato con el respectivo blanco. Realizar esta curva de calibración por triplicado en dos días diferentes.

9.2.4. Exactitud y Precisión. Repetibilidad. al 60, 100 y 140 %.

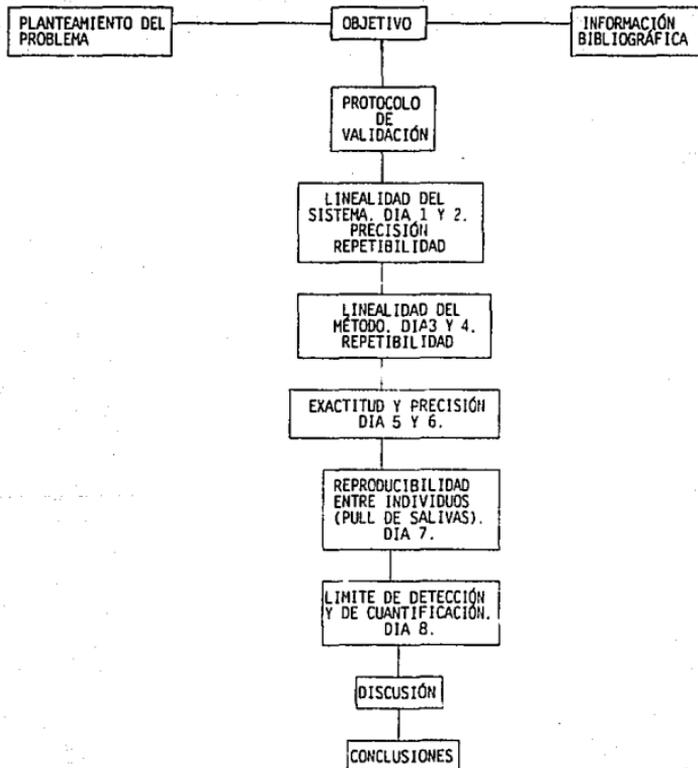
Preparar a partir de la Curva de calibración primaria de placebos añadidos de INH/SALIVA (Apéndice 2) tres concentraciones, cada una por sextuplicado, correspondientes

a el 60, 100 y 140 % (3.6, 6.0 y 8.5 mcg/ml). Aplicando el método modificado para la cuantificación de isoniacida en saliva, desarrollando finalmente la reacción de color y leyendo la absorbancia a 510 nm ajustando con el blanco. Esta prueba se realiza en dos días diferentes.

9.2.5. Limite de cuantificación y de detección.

Con el fin de determinar el límite de cuantificación y de detección del método modificado para la cuantificación de isoniacida en saliva se elaboró una curva de calibración de placebos añadidos de isoniacida en saliva cuyas concentraciones correspondieran al 50.00, 33.33, 16.67, 8.33 y 4.17 % de la concentración considerada como el 100 % (6 mcg/ml) y que son : 3.00, 2.00, 1.00, 0.50 y 0.25 mcg/ml respectivamente. Esta curva se construye a partir de la dilución adecuada en saliva de la Curva de calibración de placebos añadidos de INH/SALIVA (Apéndice 2). Con la aplicación del método modificado en cada concentración por triplicado y con el desarrollo de la reacción de color leyendo la absorbancia a 510 nm mediante el ajuste del aparato con el blanco respectivo. Este análisis se realizó el mismo día.

DIAGRAMA DE FLUJO 2
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA INH EN SALIVA



9. RESULTADOS

10. RESULTADOS

10.1. Etapa de desarrollo.

10.1.1. Procedimiento básico 1.

Los resultados obtenidos al probar diversos agentes precipitantes de proteínas en diferentes concentraciones y proporciones siguiendo el procedimiento básico propuesto en muestras de saliva adicionada con isoniacida se muestran de forma resumida en la Tabla 1.

10.1.2. Procedimiento básico 2.

-En la determinación de la influencia del agua destilada y desionizada sobre el desarrollo del complejo quelante colorido se midieron las absorbancias obtenidas en cada una de las concentraciones ensayadas por triplicado, éstas se muestran en la Tabla 2, donde se observa también el promedio y el coeficiente de variación (c. v.) para cada valor de concentración.

-De la misma manera en la determinación del volumen apropiado de agente complejante (A. C.) se muestran las absorbancias obtenidas para los diferentes volúmenes probados en la Tabla 3 y Figura 1.

-En el establecimiento del efecto de diferentes sistemas de solventes sobre la extracción de isoniacida en muestras de saliva adicionada, siguiendo el procedimiento básico 2 propuesto, se determinaron las absorbancias de los extractos acuosos las cuales se interpolaron en la curva estándar de isoniacida en agua. Los resultados obtenidos representados en porcentaje de recobro se muestran en las Tablas 4, 5, 7 y 8 para cada una de las mezclas ensayadas. Mediante estas experiencias también se establece cual de los sistemas limpia mejor la muestra, obteniéndose blancos con menor respuesta.

-Una vez seleccionado el procedimiento básico 2 como el apropiado para los fines del estudio se procedió a la optimización del mismo mediante el estudio de sus variables experimentales más importantes.

-Se siguió el procedimiento establecido para la determinación de la influencia del agente responsable del efecto salting out en el porcentaje de recobro de isoniacida en muestras de saliva adicionada en el sistema butanol,

sometiendo las muestras a dos condiciones experimentales diferentes: De tipo y tiempo de agitación en la reextracción, se obtuvieron las absorbancias de los extractos acuosos y se interpolaron en la curva estándar de isoniácida en agua expresando los resultados en porcentaje recuperado en las Tablas 4 y 5. En estas tablas se observan también los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del tipo y tiempo de agitación en la reextracción reflejada en el porcentaje recuperado.

-Después de determinar el sistema de solventes, el agente responsable del efecto salting out y el tipo y tiempo de agitación en la reextracción más adecuados se prosiguió con el estudio del efecto del pH sobre el porcentaje de recobro de isoniácida a partir de soluciones acuosas, en el cual se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 6 y Figura 2.

-De acuerdo a el procedimiento propuesto para el estudio del efecto de la proporción de la mezcla de solventes butanol:cloroformo seleccionada para la extracción de isoniácida en muestras de saliva adicionada se obtuvieron las absorbancias de los extractos acuosos para cada proporción ensayada, y se interpolaron en la curva estándar de isoniácida en agua; estos resultados se presentan en porcentaje de recobro en la Tabla 9 y Figura 3.

-Una vez determinada la proporción óptima de la mezcla butanol:cloroformo (60:40) se determinó la influencia del pH de extracción en el porcentaje de recobro de isoniácida en saliva adicionada para esta mezcla, los resultados obtenidos de acuerdo con el procedimiento propuesto se muestran en la Tabla 11 y Figura 4.

-En la determinación de la influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo (45° y 20°) en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica según el procedimiento propuesto, se obtuvieron las absorbancias contra agua y contra los blancos trabajados (1 y 2), estas lecturas se muestran en las Tablas 13 y 14.

-Igualmente, después de seguir el procedimiento propuesto para la determinación de la influencia del volumen de la mezcla de solventes seleccionada y la cantidad en gramos del agente responsable del efecto salting out seleccionado en la extracción de isoniácida en saliva adicionada se registraron las absorbancias obtenidas contra agua y contra el blanco respectivo en cada tratamiento, estos datos se muestran en la Tabla 16.

-Las condiciones finales determinadas como óptimas para el método propuesto en la cuantificación de isoniácida en muestras de saliva adicionada se muestran en el Diagrama de flujo 3.

-Los resultados del ensayo preliminar propuesto del método adaptado se muestran en la Tabla 18 y Figura 5.

10.2. Etapa de validación.

Los parámetros que incluye la validación del método analítico adaptado para la cuantificación de isoniácida en muestras de saliva adicionada, linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad entre individuos, límite de detección y de cuantificación, fueron determinados según el protocolo propuesto de acuerdo a un diseño factorial totalmente al azar y presentados en las Tablas y Figuras correspondientes.

De la misma forma, se trazó un gráfico de la cantidad recuperada en función de la cantidad añadida de isoniácida en mcg/ml para determinar el porcentaje de recobro del método analítico adaptado en el intervalo de concentraciones de 2 a 10 mcg/ml de isoniácida adicionada a saliva (Tabla 29 y Figura 8).

TABLA 1. AGENTES PRECIPITANTES DE PROTEÍNAS PROBADOS (A. P. P.).

A. P. P.	CONCENTRACIÓN	PROPORCIÓN	OBSERVACIONES	RESULTADOS
ACIDO TRICLORO ACÉTICO	15 % P/V 10 % P/V	1:2 1:3 1:2 1:1.5	-AUMENTO EN LA VISCOSIDAD -EL BLANCO REACCIONA CON EL A.C.	PORCENTAJE DE RECOBRO APROX. 55%. LECTURA DE BLANCO DISPARADA.
ACIDO PERCLÓRICO	6 % P/V	1:15	-NO SE OBSERVA DESARROLLO DE REACCIÓN DE COLOR	RESULTADO NEGATIVO.
ACIDO FOSFÓRICO	5 % P/V	1:15	-IDEM.	IDEM.
SULFATO DE AMONIO	SATURADO	1:2	-EL BLANCO DA REACCIÓN POSITIVA -EN AGUA NO SE ANULA	LECTURA DEL BLANCO MAYOR A 2. EL PORCENTAJE DE RECOBRO NO SE PUEDE DETERMINAR.
SULFATO DE ZINC E HIDRÓXIDO DE BARIO	COMBINADAS 10 % P/V Y 0.6 N 10% P/V Y 0.00006 N 5 % P/V Y 0.3 N 5 % P/V Y 0.3 N	1:2 1:1	-FORMACIÓN DE PRECIPITADO SEMIDURO BLANCO EN MUESTRA Y AGUA -CON ACIDO CLORHÍDRICO FORMA PRECIPITADO BLANCO ESPONJOSO -NO SE PRESENTA DESARROLLO DE COLOR. SOLO AL AZAR	RESULTADO NEGATIVO REACCIÓN POSITIVA AL AZAR.
SULFATO DE ZINC E HIDRÓXIDO DE BARIO	5 % P/V Y 0.3 N	0.85 ml 2 ml	-EL BLANCO NO INTERFIERE -LA MUESTRA DA REACCIÓN POSITIVA MUY POBRE	REACCIÓN POSITIVA POBRE.

SULFATO DE ZINC E HIDRÓXIDO DE BARIO	SOLUCIONES VALORADAS	CANTIDADES EQUIVALENTES	-EL BLANCO NO INTERFIERE -LA MUESTRA DA REACCIÓN POSITIVA POBRE -EN OCASIONES LA REACCIÓN SE ANULA	PORCENTAJE DE RECUBRO APROX. 50%. ANULACIÓN DE LA REACCIÓN AL AZAR.
HIDRÓXIDO DE BARIO	0.2 N	1:2	-EL BLANCO INTERFIERE	INTERFERENCIA DEL BLANCO POSITIVA, EL % DE RECUBRO NO SE PUEDE DETERMINAR.
SULFATO DE ZINC E HIDRÓXIDO DE SODIO	10 % P/V Y 5 N	1:2	-SE ANULA LA REACCIÓN	RESULTADO NEGATIVO.

TABLA 2. Influencia del agua destilada y desionizada en el desarrollo de la reacción de color.

TIPO DE AGUA	CONCENTRACIÓN mcg/ml	ABSORBANCIA \bar{X}			C.V. %	
		1	2	3		
	0.8	0.149	0.149	0.149	0.149	0.00
Desionizada	6.0	1.015	1.012	1.018	1.015	0.30
	10.0	1.454	1.483	1.499	1.479	1.54
	0.8	0.010	0.013	0.011	0.011	13.48
Destilada	6.0	0.675	0.691	0.702	0.689	1.97
	10.0	1.321	1.328	1.340	1.330	0.72

TABLA 3. Efecto del volumen de agente complejante.

CONCENTRACIÓN mcg/ml	VOLUMEN DE AGENTE COMPLEJANTE		
	0.2ml	0.4ml	0.5ml
2	0.348	0.361	0.352
4	0.665	0.688	0.697
6	0.795	1.000	1.030
8	0.787	1.292	1.301
10	0.805	1.507	1.589

$m=0.07817$ $m=0.15200$ $m=0.15390$
 $b=0.17581$ $b=0.04800$ $b=0.07040$
 $r^2=0.79790$ $r^2=0.99420$ $r^2=0.99730$

FIGURA No 1
EFECTO DEL VOLUMEN DE AGENTE COMPLEJANTE

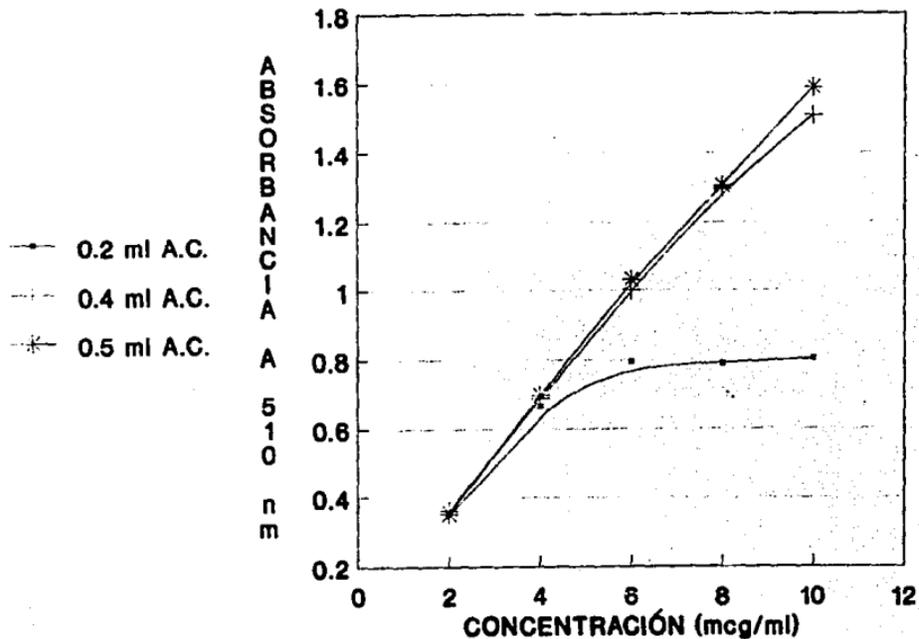


TABLA 4. Datos del porcentaje de recobro de isoniacida obtenidos en los sistemas de solventes A, B Y C.

NÚMERO DE ENSAYO	PORCENTAJE DE RECOBRO (%)		
	SISTEMA A	SISTEMA B	SISTEMA C
1	68.63	34.06	53.07
2	37.28	45.80	66.96
3	44.99	31.73	66.96
4	35.77	26.97	62.01
5	42.05	24.65	58.02
MEDIA	45.74	32.64	61.40

Sistema A: Alcohol isoamílico:éter 85:15/saliva adicionada (6 mcg/ml de INH) con 1 ml de sulfato de amonio al 15 % p/v y 3 g del mismo. Sistema B: Butanol/saliva adicionada (6 mcg/ml de INH) con 1 ml de acetato de sodio 4 M y 3 g de sulfato de amonio. Sistema C: Butanol/saliva adicionada (6 mcg/ml de INH) con 3 g de sulfato de amonio. Condiciones experimentales: 10 segundos de agitación en vortex en la extracción y en la reextracción.

TABLA 5. Datos del porcentaje de recobro de isoniacida obtenidos en los sistemas de solventes B y C.

NÚMERO DE ENSAYO	PORCENTAJE DE RECOBRO (%)	
	SISTEMA B	SISTEMA C
1	72.60	64.03
2	35.82	70.74
3	57.77	66.67
4	54.20	69.57
5	46.80	68.12
MEDIA	53.44	67.83

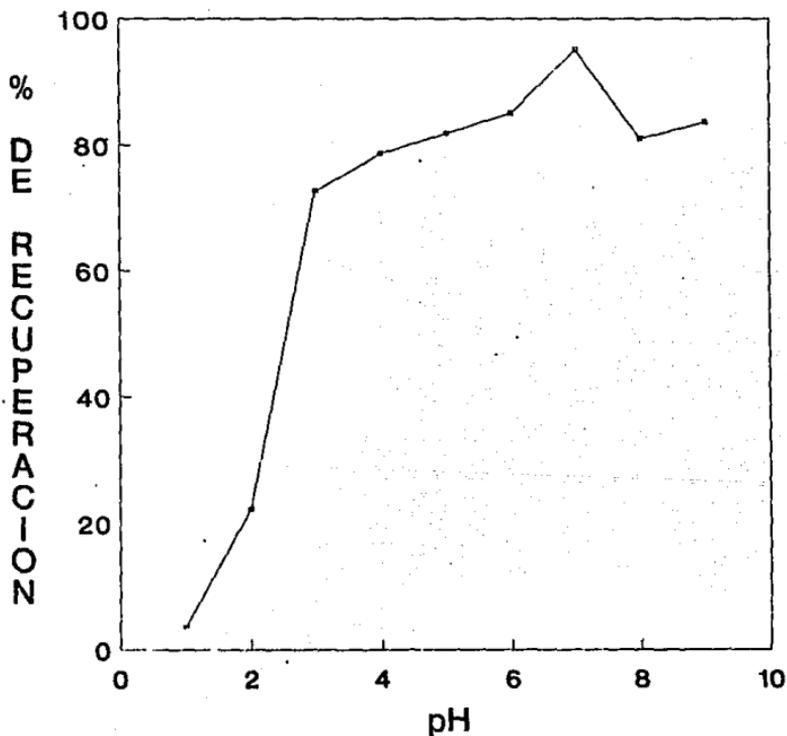
Condiciones experimentales: 10 segundos de agitación en vortex en la extracción y 20 minutos de agitación mecánica en la reextracción.

TABLA 6. Influencia del pH sobre el porcentaje de recobro de isoniacida en el sistema butanol/agua .

pH	ABSORBANCIA A 510 nm	PORCENTAJE DE RECOBRO (%)
1	0.044	3.60
2	0.270	22.20
3	0.927	72.65
4	1.005	78.66
5	0.998	81.90
6	1.037	85.00
7	1.162	95.10
8	0.991	81.10
9	1.025	83.66

Condiciones experimentales: 2 minutos de agitación en vortex en la extracción, centrifugación a 2000 rpm durante 17 minutos y 30 minutos de agitación mecánica en la reextracción. Concentración de trabajo 6 mcg/ml de INH.

FIGURA No 2
INFLUENCIA DEL pH SOBRE EL % DE RECOBRO



-- DATOS EXP.

DE INH EN EL SISTEMA BUTANOL-AGUA

TABLA 7. Datos del porcentaje de recobro de isoniacida obtenidos en el sistema de solventes D.

NÚMERO DE ENSAYO	PORCENTAJE DE RECOBRO (%)
1	59.25
2	62.87
3	57.44
4	62.44
5	55.50
6	45.20
MEDIA	57.12

Sistema D: Butanol/saliva adicionada (6 mcg/ml de INH) con agentes precipitantes sulfato de zinc 10 % p/v e hidróxido de sodio 5 N proporción 1:2. Condiciones experimentales: 2 minutos de agitación en vortex en la extracción, centrifugación a 2000 rpm durante 17 minutos, 30 minutos de agitación mecánica en la reextracción y pH de extracción de 7.

TABLA 8. Datos del porcentaje de recobro de isoniacida obtenidos en los sistemas de solventes C Y E.

NÚMERO DE ENSAYO	PORCENTAJE DE RECOBRO (%)	
	SISTEMA C	SISTEMA E
1	70.26	75.39
2	73.76	73.89
3	75.91	72.39
MEDIA	73.71	73.89

E: Butanol:cloroformo 90:10 con 3 g de sulfato de amonio. Condiciones experimentales ibit.

TABLA 9. Datos del porcentaje de isoniacida recuperada en muestras de saliva adicionada (6 mcg/ml de INH) con respecto a la proporción de la mezcla de solventes butanol:cloroformo.

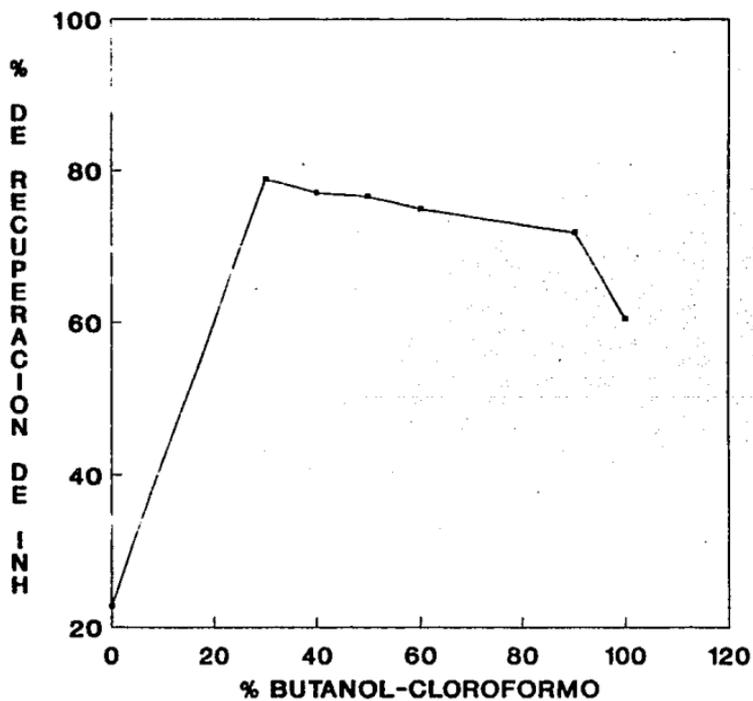
% DE MEZCLA	PORCENTAJE DE RECOBRO				
	1	2	3	4	5
BUTANOL:CLOROFORMO					
100: 00	60.40	60.40	63.09	56.11	62.82
90: 10	70.17	70.17	75.17	73.06	70.90
60: 40	73.52	73.33	77.50	74.44	75.83
50: 50	72.67	76.67	77.47	78.13	78.13
40: 60	77.17	81.82	77.16	76.62	72.64
30: 70	73.90	82.88	85.56	72.60	79.30
00:100	26.32	29.88	10.83	21.07	26.76

Condiciones experimentales: ibit, volumen de la mezcla de solventes 10 ml.

TABLA 10. Datos estadísticos para la evaluación de la proporción de la mezcla butanol:cloroformo más adecuada.

% DE MEZCLA	% DE RECOBRO	
	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
BUTANOL:CLOROFORMO		
100: 00	60.56	2.800095
90: 10	71.89	2.180832
60: 40	74.92	1.746634**
50: 50	76.61	2.285143
40: 60	77.08	3.256044
30: 70	78.88	5.590896
00:100	22.97	7.488730

FIGURA No 3
INFLUENCIA DEL % DE LA MEZCLA



— DATOS EXP.

BUTANOL CLOROFORMO EN EL % RECUPERADO

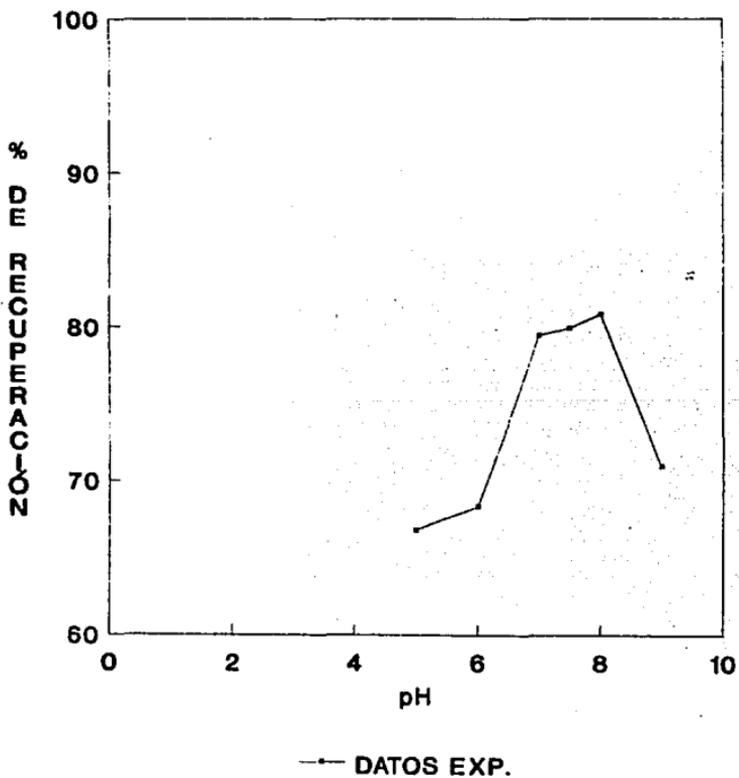
TABLA 10. Influencia del pH sobre el porcentaje de recobro de isoniacida en el sistema butanol: cloroformo 60:40/saliva adicionada (6 mcg/ml de INH).

pH	ABSORBANCIA A 510 nm			PORCENTAJE DE RECOBRO		
	1	2	3	1	2	3
5.0	0.467	0.491	0.461	65.93	69.34	65.08
6.0	0.450	0.530	0.510	61.93	72.94	70.18
7.0	0.575	0.585	0.560	79.68	81.06	77.60
7.5	0.608	0.568	0.590	82.53	77.11	80.09
8.0	0.570	0.570	0.610	78.98	78.98	84.53
9.0	0.500	0.505	0.495	70.59	71.29	69.88

TABLA 12. Datos estadísticos para la evaluación del pH de extracción óptimo en el sistema butanol:cloroformo 60:40/saliva adicionada (6 mcg/ml de INH).

pH	MEDIA	DESVIACIÓN	COEFICIENTE DE
	% DE RECOBRO	ESTÁNDAR	VARIACIÓN (c.v.)
5.0	66.78	2.254558	3.3759
6.0	68.35	5.728586	8.3813
7.0	79.45	1.741762	2.1924
7.5	79.91	2.714480	3.3969**
8.0	80.83	3.204294	3.9642
9.0	70.59	0.705006	0.9988

FIGURA No 4
INFLUENCIA DEL pH SOBRE EL % DE RECOBRO



DE INH: BUTANOL CLOROFORMO 60:40/SALIVA

TABLA 13. Influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo, en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica.

NÚMERO	(mcg/ml)	ABSORBANCIA A 510 nm		
DE				
ENSAYO		vs AGUA	vs BCO 1	vs BCO 2
1	BCO 1	0.250	-----	0.045
2	6	0.740	0.490	0.530
3	6	0.780	0.540	0.575
4	6	0.800	0.558	0.595
5	6	0.800	0.558	0.595
6	6	0.830	0.580	0.620
7	6	0.780	0.530	0.570
8	6	0.765	0.540	0.580
9	6	0.780	0.520	0.550
10	6	0.850	0.620	0.650
11	6	0.760	0.530	0.570
12	6	0.765	0.520	0.560
13	6	0.785	0.550	0.580
14	6	0.800	0.560	0.600
15	6	0.750	0.510	0.540
16	BCO 2	0.215	-----	-----

Condiciones experimentales: 2 minutos de agitación en vortex en la extracción, centrifugación a 2000 rpm durante 17 minutos, 30 minutos de agitación mecánica en la reextracción, pH de la muestra (saliva adicionada con INH 6 mcg/ml) igual a 7.5, volumen de la mezcla de solventes butanol:cloroformo 60:40 10 ml. Con 45° de inclinación.

TABLA 14. Influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo, en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica.

NÚMERO DE	(mcg/ml)	ABSORBANCIA A 510 nm		
		vs AGUA	vs BCO 1	vs BCO 2
1	BCO 1	0.250	-----	0.020
2	6	0.755	0.505	0.520
3	6	0.820	0.580	0.595
4	6	0.755	0.510	0.530
5	6	0.795	0.550	0.565
6	6	0.740	0.490	0.510
7	6	0.755	0.510	0.525
8	6	0.745	0.500	0.510
9	6	0.760	0.520	0.525
10	6	0.780	0.530	0.535
11	6	0.730	0.485	0.495
12	6	0.740	0.500	0.505
13	6	0.735	0.492	0.500
14	6	0.770	0.530	0.535
15	6	0.760	0.520	0.530
16	BCO 2	0.230	-----	-----

Condiciones experimentales: ibid. sup. con 20° de inclinación.

TABLA 15. Prueba de medias para el análisis de la influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo, en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica.

Ho	t cal.	ACEPTACIÓN O RECHAZO
$M_1 = M_2$	-3.020400	RECHAZO
$M_3 = M_4$	-1.145100	ACEPTACION
$M_1 = M_3$	2.495300	RECHAZO
$M_1 = M_4$	1.452400	ACEPTACION
$M_2 = M_3$	5.859600	RECHAZO
$M_2 = M_4$	4.768700	RECHAZO
MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	GRADOS DE INCLINACIÓN
$M_1=0.543$	0.032102	45°
$M_2=0.580$	0.031590	"
$M_3=0.516$	0.025711	20°
$M_4=0.527$	0.026437	"

Criterio de aceptación: Si t calculada cae dentro del intervalo $t_{0.025} < t_c < t_{0.975}$ la hipótesis de nulidad (H_0) no se rechaza.

TABLA 16. Influencia del volumen de la mezcla de solventes butanol:cloroformo 60:40 y de los gramos de sulfato de amonio en la extracción de isoniacida en saliva adicionada (6 mcg/ml de INH).

TRATAMIENTO (mcg/ml)		ABSORBANCIA A 510 nm	
		vs AGUA	vs BCO
A	BCO	0.135	-----
	6	0.660	0.525
	6	0.650	0.515
	6	0.665	0.530
C	BCO	0.161	-----
	6	0.670	0.495
	6	0.690	0.520
	6	0.710	0.540
B	BCO	0.115	-----
	6	0.645	0.530
	6	0.660	0.540
	6	0.680	0.560
D	BCO	0.145	-----
	6	0.700	0.560
	6	0.700	0.553
	6	0.720	0.580

TRATAMIENTO**CONDICIONES EXPERIMENTALES**

A	.1.5 g DE SULFATO DE AMONIO .5 ml DE LA MEZCLA DE SOLVENTES
B	.3.0 g DE SULFATO DE AMONIO .5 ml DE LA MEZCLA DE SOLVENTES
C	.1.5 g DE SULFATO DE AMONIO .10 ml DE LA MEZCLA DE SOLVENTES
D	.3.0 g DE SULFATO DE AMONIO .10 ml DE LA MEZCLA DE SOLVENTES

TABLA 17. Datos estadísticos para la evaluación de la influencia del volumen de la mezcla de solventes butanol:cloroformo 60:40 y de los gramos de sulfato de amonio en la extracción de isoniacida en saliva adicionada (6 mcg/ml de INH).

TRATAM.	vs AGUA				vs BCO			
	\bar{X}	D.S.	C.V.	%R	\bar{X}	D.S.	C.V.	%R
A	0.658	0.0062	0.95	74.40	0.523	0.0062	1.19	74.40
B	0.662	0.0143	2.17	77.73	0.543	0.0125	2.30	77.25
C	0.690	0.0163	2.37	75.21	0.518	0.0184	3.55	73.79
D	0.707	0.0094	1.33	79.88	0.564	0.0114	2.03	80.24

TRATAM. = TRATAMIENTO.

TABLA 18. Datos del ensayo preliminar del método modificado para la cuantificación de isoniacida en saliva, curva de calibración de placebos añadidos de isoniacida/saliva.

CONCENTRACIÓN mcg/ml	ABSORBANCIA A 510 NM	
	DIA 1	DIA 2
	0.061	0.119
0.6	0.104	0.066
	0.084	0.042
MEDIA	0.083	0.076
	-----	0.121
1.2	0.126	0.077
	0.155	0.108

TABLA 18. Continuación.

MEDIA	0.141	0.102
	0.332	0.283
2.4	0.367	0.343
	0.311	0.246
MEDIA	0.337	0.291
	0.568	0.533
4.8	0.794	0.502
	0.556	0.507
MEDIA	0.639	0.514
	1.027	0.927
9.6	1.082	0.989
	1.082	0.934
MEDIA	1.055	0.950
	1.606	1.406
14.4	1.596	1.451
	1.596	1.580
MEDIA	1.599	1.479

Regresión lineal:

día 1
 $m=0.10931$
 $b=0.03516$
 $r^2=0.99476$

día 2
 $m=0.10121$
 $b=0.01030$
 $r^2=0.99780$

DIAGRAMA DE FLUJO 3
 DETERMINACIÓN DE ISONIACIDA EN SALIVA
 (MÉTODO DE PRODRAMOS MODIFICADO)

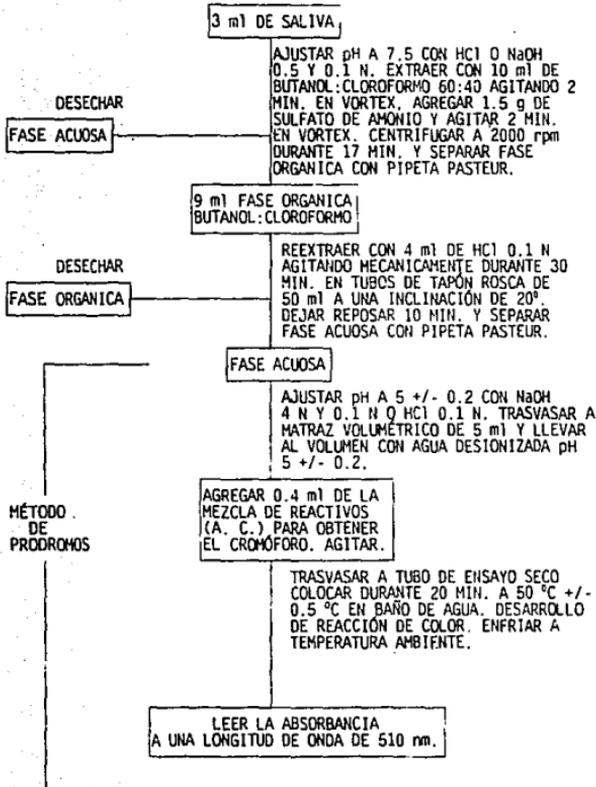


TABLA 19. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA A 510 nm							
	DÍA 1			DÍA 2			\bar{X}	SD \bar{X} (n-1)
(mcg/ml)	1	2	3	4	5	6		
0.80	0.151	0.151	0.151	0.149	0.149	0.149	0.150	0.001095
1.60	0.284	0.295	0.294	0.285	0.296	0.292	0.291	0.005215
2.00	0.358	0.360	0.354	0.363	0.364	0.369	0.361	0.005203
3.20	0.551	0.564	0.555	0.549	0.550	0.550	0.553	0.005707
4.00	0.685	0.696	0.698	0.696	0.701	0.700	0.696	0.005762
6.00	0.986	0.995	1.002	1.015	1.012	1.018		
6.00	1.006	1.004	1.006	1.042	1.046	1.036	1.014	0.018700
8.00	1.247	1.260	1.253	1.285	1.200	1.281	1.268	0.016300
10.00	1.471	1.479	1.466	1.454	1.483	1.499	1.475	0.015500

TABLA 20. Datos estadísticos para la evaluación de la linealidad del sistema para isoniácida.

CONCENTRACIÓN	c.v.	$\bar{X}-1.96SDx$	$\bar{X}+1.96SDx$
0.80	0.720	0.148	0.152
1.60	1.792	0.281	0.301
2.00	1.440	0.351	0.372
3.20	1.032	0.542	0.564
4.00	0.828	0.685	0.707
6.00	1.840	0.977	1.051
8.00	1.287	1.236	1.300
10.00	1.047	1.445	1.506

TABLA 21. Parámetros estadísticos evaluados en la linealidad del sistema para isoniacida.

PARÁMETRO	DÍA 1	DÍA 2
Pendiente	0.148554	0.150855
t cal.	-0.164873	-0.164873
t tab.	2.306000	2.306000
Ordenada al origen	0.053941	0.052508
t cal.	0.763585	0.657060
t tab.	1.894600	1.894600
Coefficiente de regresión	0.996627	0.995819
Coefficiente de determinación	0.993265	0.991655

TABLA 22. Parámetros estadísticos evaluados en la unión de los datos de la linealidad del sistema para isoniacida.

PENDIENTE	0.149698
LÍM. INF. INT. CONF.	0.148490
LÍM. SUP. INT. CONF.	0.150906
ORDENADA AL ORIGEN	0.053196
LÍM. INF. INT. CONF.	0.014733
LÍM. SUP. INT. CONF.	0.091659
t cal.	0.711656
t tab.	1.894600
ERROR ESTÁNDAR DE REGRESIÓN	0.047310

TABLA 22. Continuación.

COEFICIENTE DE REGRESIÓN	0.996247
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.992508
INTERCEPTO RELATIVO	0.082432
ERROR ESTÁNDAR RELATIVO	0.200294
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	1.25 %
PENDIENTE RELATIVA	0.917568

TABLA 23. Precisión del sistema.

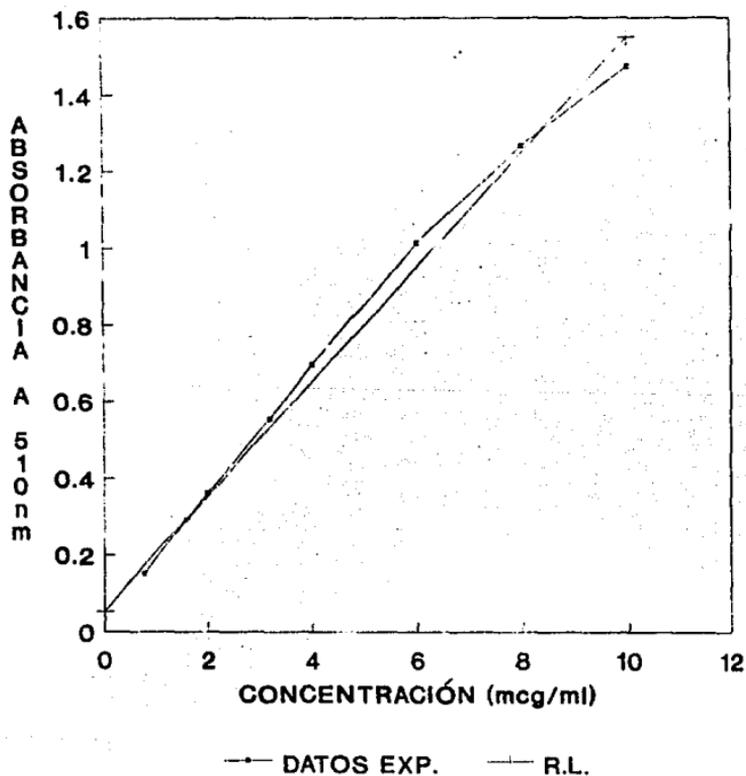
NÚMERO DE ENSAYOS	DIA 1	DIA 2
1	0.986	1.015
2	0.995	1.012
3	1.002	1.018
4	1.006	1.042
5	1.004	1.046
6	1.006	1.036

Condiciones experimentales: concentración de 6 mcg/ml de isoniacida.

TABLA 24. Parámetros estadísticos evaluados para la precisión del sistema.

MEDIA ARITMÉTICA	1.014
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.018660
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	1.84 %

FIGURA No 6
LINEALIDAD DEL SISTEMA



CURVA DE CALIBRACION DE INH-AGUA

TABLA 25. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA A 510 nm							
	DIA 1				DIA 2			
(mcg/ml)	1	2	3	4	5	6	\bar{x}	$SD\bar{x}(n-1)$
2.0	0.222	0.228	0.226	0.239	0.222	0.233	0.230	0.005891
4.0	0.482	0.474	0.474	0.474	0.471	0.498	0.479	0.010900
6.0	0.706	0.740	0.732	0.744	0.748	0.731	0.734	0.015000
8.0	0.990	1.000	0.987	0.978	0.999	0.981	0.989	0.009065
10.0	1.202	1.194	1.189	1.227	1.200	1.219	1.205	0.014800

TABLA 26. Datos estadísticos para la evaluación de la linealidad del método para isoniacida en saliva adicionada.

CONCENTRACIÓN	c.v. (%)	$\bar{x}-1.96SD\bar{x}(n-1)$	$\bar{x}+1.96SD\bar{x}(n-1)$
(mcg/ml)			
2.0	2.557	0.218	0.241
4.0	2.107	0.459	0.499
6.0	2.047	0.704	0.763
8.0	0.916	0.971	1.007
10.0	1.226	1.176	1.234

TABLA 27. Parámetros estadísticos evaluados en la linealidad del método para isoniácida en saliva adicionada.

PARÁMETRO	DÍA 1	DÍA 2
Pendiente	0.121791	0.112867
t cal.	-0.247083	-0.247082
t tab.	2.570600	2.570600
Ordenada al origen	-0.000640	-0.005222
t cal.	-0.220715	-0.312727
t tab.	2.131800	2.131800
Coefficiente de regresión	0.999486	0.999832
Coefficiente de determinación	0.998971	0.999664

TABLA 28. Parámetros estadísticos evaluados en la unión de los datos de la linealidad del método para isoniácida en saliva adicionada.

PENDIENTE	0.122279
LÍM. INF. INT. CONF.	0.121797
LÍM. SUP. INT. CONF.	0.122761
ORDENADA AL ORIGEN	-0.005365
LÍM. INF. INT. CONF.	-0.019400
LÍM. SUP. INT. CONF.	0.008671
t cal.	-0.249228
t tab.	2.131800
ERROR ESTÁNDAR DE REGRESIÓN	0.012143

TABLA 28. Continuación.

COEFICIENTE DE REGRESIÓN	0.999718
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.999437
INTERCEPTO RELATIVO	-0.008853
ERROR ESTÁNDAR RELATIVO	0.151034
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	1.77 %
PENDIENTE RELATIVA	1.008853

TABLA 29. Datos de la curva de concentración recuperada vs concentración añadida.

CONCENTRACIÓN AÑADIDA	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (mcg/ml)						
	DIA 1			DIA 2			
(mcg/ml)	1	2	3	4	5	6	\bar{X}
2.00	1.1276	1.1677	1.1544	1.2412	1.1276	1.2011	1.1699
4.00	2.8645	2.8110	2.8110	2.9714	2.8110	2.7910	2.8433
6.00	3.3608	4.5879	4.5345	4.6147	4.6414	4.5278	4.5445
8.00	6.2580	6.3248	6.2379	6.1778	6.3181	6.1979	6.2524
10.00	7.6742	7.6208	7.5873	7.8412	7.6608	7.7877	7.6953

TABLA 30. Datos estadísticos para la evaluación de la concentración recuperada en función de la concentración añadida.

CONCENTRACIÓN AÑADIDA		INTERVALO DE CONFIANZA		
(mcg/ml)	c.v. (%)	SDx(n-1)	$\bar{X}-1.96SDx(n-1)$	$\bar{X}+1.96SDx(n-1)$
2.00	3.800	0.044400	1.082830	1.257053
4.00	2.400	0.067400	2.775925	2.975396
6.00	2.200	0.100300	4.347907	4.741134
8.00	1.000	0.060500	6.133723	6.371090
10.00	1.300	0.098700	7.501924	7.888705

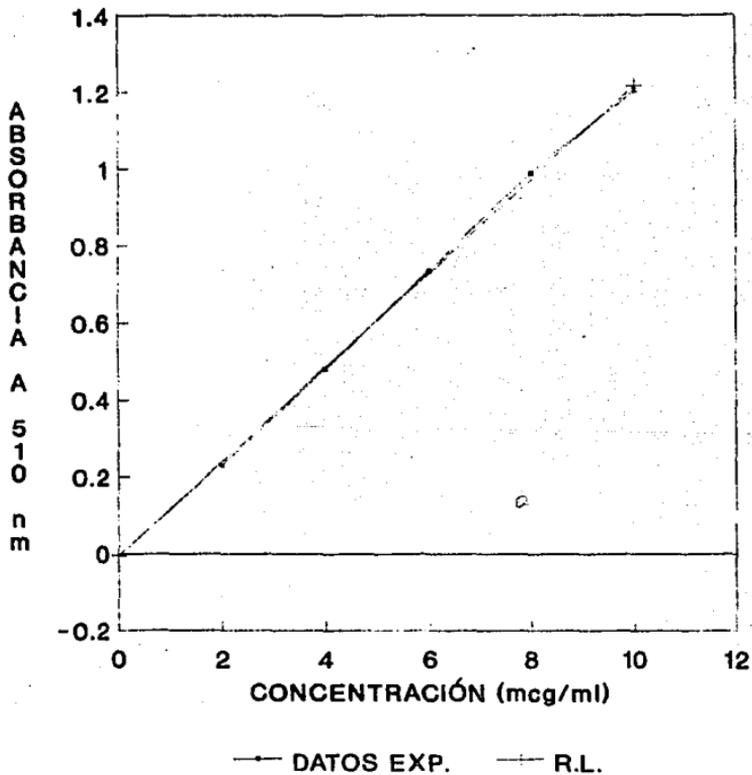
TABLA 31. Parámetros estadísticos evaluados en la relación concentración recuperada vs concentración añadida en la linealidad del método para isonicácida en saliva adicionada.

PENDIENTE	0.791788
LÍM. INF. INT. CONF.	0.790984
LÍM. SUP. INT. CONF.	0.792592
ORDENADA AL ORIGEN	-0.208025
LÍM. INF. INT. CONF.	-0.404091
LÍM. SUP. INT. CONF.	-0.011959
t cal.	-0.691788
t tab.	2.131800
COEFICIENTE DE REGRESIÓN	0.998691
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.997384

TABLA 31. Continuación.

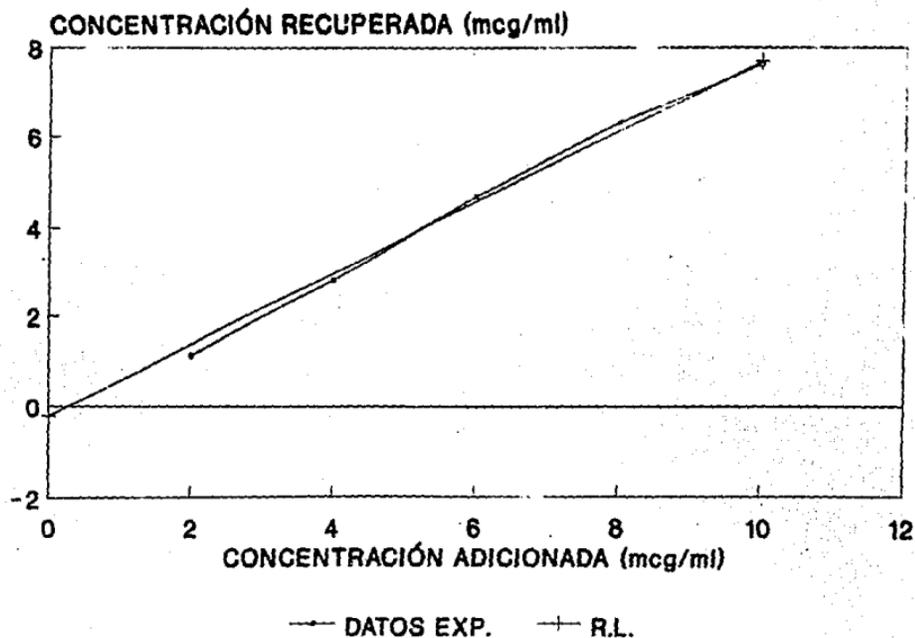
INTERCEPTO RELATIVO	-0.055460
ERROR ESTÁNDAR RELATIVO	0.158174
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	2.14 %
PENDIENTE RELATIVA	1.055460

FIGURA No 7
LINEALIDAD DEL MÉTODO



CURVA DE CALIBRACIÓN DE INH-SALIVA

FIGURA No 8
CURVA CONC. ADIC. vs CONC. REC.



mcg/ml ADICIONADOS vs mcg/ml RECUPERADOS

TABLA 32. EXACTITUD Y PRECISIÓN.

	ABSORBANCIA A 510 nm			PORCENTAJE RECUPERADO (%)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
	0.435	0.717	0.986	100.04	98.46	95.38
	0.416	0.733	1.003	95.72	100.64	97.02
DÍA 1	0.451	0.731	1.061	103.67	100.37	102.60
	0.443	0.754	1.047	101.85	103.50	101.25
	0.426	0.725	0.995	97.99	99.55	96.25
	0.446	0.743	1.054	102.54	102.00	101.92
	0.433	0.687	0.969	99.58	94.37	93.75
	0.425	0.710	0.984	97.77	97.50	95.19
DÍA 2	0.427	0.724	1.009	98.22	99.41	97.59
	0.444	0.703	1.027	102.08	96.55	99.33
	0.437	0.703	1.001	100.49	96.55	96.82
	0.440	0.703	1.015	101.17	96.01	98.17

TABLA 33. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

FUENTE DE VARIACIÓN	g. l.	S.C.	M. C.	F exp.	F tab.
Concentración	2	28.44	14.22	2.65	3.32
Día	1	44.89	44.89	8.36	4.17
Día-Concentración	2	19.50	9.75	1.81	3.32
Error experimental	30	161.13	5.37		

TABLA 34. Parámetros estadísticos para la evaluación de la exactitud y precisión del método.

MEDIA	98.93 %
LÍM. INF. INT. CONF.	98.01 %
LÍM. SUP. INT. CONF.	99.84 %
t cal.	-2.394491
t tab. (0.95)	2.030100
t tab. (0.99)	2.728900
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	2.693683
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	2.72 %

TABLA 35. PULL DE SALIVAS.

ABSORBANCIA A 510 nm			PORCIENTO DE RECUBRO (%)		
INDIVIDUO					
A	B	C	A	B	C
0.695	0.680	0.745	95.50	93.42	102.28
0.693	0.733	0.752	95.19	100.64	103.23
0.680	0.739	0.715	93.92	101.46	98.19
0.670	0.744	0.755	92.05	102.14	103.64
0.671	0.744	0.755	92.19	102.14	103.64

Condiciones experimentales:

Concentración 6 mcg/ml.

Tres individuos sanos:

A (18 años)

B (23 años)

C (30 años)

Cinco ensayos.

TABLA 36. ANALISIS DE VARIANZA PARA PULL DE SALIVAS.

FUENTE DE VARIACIÓN	g. l.	S.C.	M.C.	F exp.	F tab.
INDIVIDUO	2	190.52	95.26	13.17	3.88
ERROR	12	86.77	7.23		
TOTAL	14	277.29	19.81		

TABLA 37. Prueba de Medias para el Pull de de Salivas.

Ho	t cal.	DECISIÓN	
		t 0.95	t 0.99
$M_A = M_B$	-3.962891	RECHAZO	ACEPTACIÓN
$M_A = M_C$	-7.254357	RECHAZO	RECHAZO
$M_B = M_C$	-1.144912	ACEPTACIÓN	ACEPTACIÓN

TABLA 37. Continuación.

MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
$M_A = 93.77 \%$	1.619151
$M_B = 99.96 \%$	3.707722
$M_C = 102.20 \%$	2.307299

t 0.95 = 2.776400

t 0.99 = 4.604000

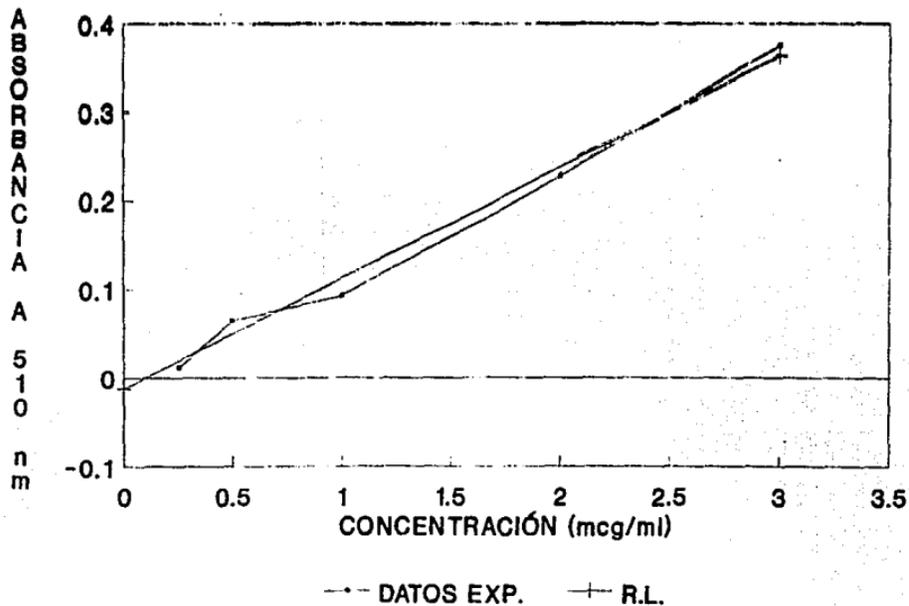
TABLA 38. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DE DETECCIÓN.

CONCENTRACIÓN (mcg/ml)	ABSORBANCIA A 510 nm			\bar{x}
	1	2	3	
0.25	0.011	0.005	0.018	0.011
0.50	0.061	0.055	0.078	0.065
1.00	0.092	0.089	0.093	0.093
2.00	0.227	0.228	0.224	0.226
3.00	0.348	0.387	0.373	0.373

TABLA 39. Parámetros estadísticos evaluados para el Límite de Detección y de Cuantificación.

PENDIENTE	0.124277
ORDENADA AL ORIGEN	-0.011762
COEFICIENTE DE REGRESIÓN	0.994950
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.989927
ERROR ESTÁNDAR DE REGRESIÓN	0.016248
LÍMITE DE DETECCIÓN	0.198267 mcg/ml
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	1.375693 mcg/ml

FIGURA No 9
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DE DETECCIÓN



ABSORBANCIA A 510 nm vs CONCENTRACIÓN

11. DISCUSIÓN

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

11. DISCUSIÓN

Con el objeto de comprobar la influencia del tipo de agua en la reacción de color reportada por I. Prodromos (29) en el método analítico para la cuantificación de microcantidades de isoniacida en agua se realizaron ensayos con agua destilada y desionizada. En ellos se observó claramente la interferencia del agua destilada, debida a los iones presentes, los cuales disminuyen la respuesta de forma considerable en el intervalo de concentraciones de 0.8 a 10.0 mcg/ml y aumenta la variación. Decrece, así, la sensibilidad del método. Por eso realmente es necesario trabajar con agua desionizada para que las lecturas sean adecuadas y homogéneas en el mismo intervalo de concentraciones (ver Tabla 2).

La influencia del volumen de agente complejante fué estudiada en un trabajo anterior al presente (62) donde se estableció un volumen óptimo de agente complejante (A. C.) de 2 ml para una dilución final de 25 ml, el doble del usado por Prodromos (29). En este trabajo se maneja una dilución final de 5 ml, por lo que fué necesario realizar también este estudio con el equivalente del volumen utilizado por Prodromos, (200 mcl), el equivalente a el doble (400 mcl) y uno mayor (500 mcl). Esto permitió establecer la cantidad de agente complejante óptima (400 mcl), con la que se obtiene una respuesta lineal adecuada en un intervalo de concentraciones de 2 a 10 mcg/ml y el ahorro del reactivo (Tabla 3 y Figura 1). También el volumen apropiado es, en efecto, el doble del reportado por Prodromos.

Procedimiento básico 1:

Este procedimiento fué propuesto por la aparente facilidad y rapidez que constituye la limpieza de la muestra por agentes precipitantes de proteínas (22, 23, 63). Sin embargo, los resultados obtenidos con los agentes probados (ver Tabla 1) no son adecuados para este estudio. Con la mayoría de ellos se anula la reacción de color (ácido perclórico, ácido fosfórico, sulfato de zinc e hidróxido de bario en concentraciones altas, sulfato de zinc e hidróxido de sodio.) esto nos indica que interfieren posiblemente con la formación del complejo INH-Ortufenantrolina-Hierro(II) dada su naturaleza ácida y/o iónica. El sulfato de amonio y el hidróxido de bario no interfieren con la reacción pero son malos agentes precipitantes de proteínas y dan blancos positivos altos. El ácido tricloroacético aumenta de manera

marcada la viscosidad del medio y los blancos dan positivos; esto nos indica la formación posible de un coloide y/o la mala limpieza de la muestra por lo que se descartó aunque el porcentaje de recobro obtenido fué del 55 % aproximadamente. La única opción viable es el uso de sulfato de zinc e hidróxido de bario, en cantidades equivalentes (22). Con éstos se limpia la muestra de manera adecuada y el porcentaje de recobro obtenido es del 50 % aproximadamente (medianamente adecuado para los fines del estudio) pero la inestabilidad de las soluciones de hidróxido de bario provoca la anulación de la reacción en los ensayos, resultando impráctico su uso.

Las dificultades anteriores nos indican que este procedimiento no es el adecuado dado que no se obtienen resultados favorables por lo que se avocó el trabajo con el segundo procedimiento propuesto.

Procedimiento básico 2:

El primer paso a seguir fué el de probar diferentes sistemas de solventes para la extracción de isoniácida reportados en la bibliografía como son: Alcohol isoamílico:éter etílico 85:15 (62, 64) y butanol (13, 65) para establecer su eficiencia en la extracción del principio activo. Al mismo tiempo se usó la adición de sulfato de amonio en el primer sistema (A), acetato de sodio y sulfato de amonio en el segundo (B) y sólo sulfato de amonio con éste último sistema (C) para producir el efecto salino descrito en la bibliografía (13, 62, 66). Tomando como base el porcentaje extraído y la homogeneidad de los resultados se observa que el mejor sistema de extracción es el C butanol con sólo sulfato de amonio ya que da el mayor porcentaje de extracción de 61.40 % y la mayor homogeneidad de las muestras con respecto a las de alcohol isoamílico:éter etílico 85:15 (A) y butanol con acetato de sodio y sulfato de amonio (B) que fueron de 45.74 %, menor homogeneidad y 32.64 %, mediana homogeneidad (ver Tabla 4). Desde este momento este procedimiento se eligió como el apropiado, y se procedió a optimizar sus variables experimentales.

La eficiencia se mejoró utilizando en la reextracción agitación mecánica durante un tiempo mayor de 20 minutos, aumentó el porcentaje de extracción en el sistema C a 67.83 % y en el B a 53.44 %. El tipo y tiempo de agitación se estandarizó a mecánica durante 30 minutos, que se considera como la más adecuada (ver Tablas 4 y 5).

Al determinar el mejor sistema de extracción se encontró que ésta es butanol con sulfato de amonio (C) como agente salino, (el cual no interfiere en las etapas subsecuentes del método) y estandarizando el tipo y tiempo de extracción, se procedió a determinar la influencia del pH en la extracción de isoniácida para el sistema en agua. Se observó que el pH donde se mejora notablemente la eficiencia de la extracción es el de 7 con un 95.10 % de porcentaje de extracción, concordando con el reportado (62, 65) (ver Tabla 6 y Figura 2).

Establecidas las condiciones anteriores (sistema de extracción: butanol con sulfato de amonio (C), tipo y tiempo de agitación: mecánica durante 30 minutos y pH de extracción de 7) se procedió a probarlas en el sistema ya establecido y en otros dos: Butanol con agente precipitantes sulfato de zinc e hidróxido de sodio (D) y butanol:cloroformo 90:10 (E) con el propósito de mejorar la limpieza de la muestra. El porcentaje de extracción se observa constante en el sistema C y E de 73.71 % y 73.89 % respectivamente, pero el blanco en éste último mejoró apreciablemente con respecto a el primero; el mejor blanco obtenido fué el del sistema con agentes precipitantes de proteínas (D) pero el porcentaje de extracción disminuyó notablemente 57.12 %, por lo que el sistema de elección es el E butanol:cloroformo 90:10 por mantener el porcentaje de extracción y mejorar los blancos (ver Tablas 7 y 8).

Con el objeto de determinar la mejor proporción de la mezcla de solventes seleccionada (butanol:cloroformo 90:10) se probaron varias proporciones de la misma, y se encontró que la proporción más adecuada es la de 60:40 debido a que con ésta se obtiene un porcentaje de recobro adecuado para los fines del estudio (74.92 %) con la menor variación posible reflejada en su desviación estándar que es la menor de todas las demás; esto es debido en gran parte a que en esta proporción se maneja más fácilmente la muestra durante el ensayo gracias a la poca formación de emulsión. Además no se observa inversión de fases como en otras en las que predomina el cloroformo en donde aunque el porcentaje de recobro es mayor, la variación entre los resultados también es mayor por el difícil manejo de la muestra debida a la formación de emulsión que dificulta la agitación y la separación de las fases, no encontrándose adecuadas (ver Tablas 9 y 10, y Figura 3).

Establecida la mejor proporción de la mezcla butanol:cloroformo, se prosiguió con la determinación de la influencia del pH en la extracción de la isoniácida en muestras de saliva adicionada, se encontró que el pH más favorable es el de 7.5 ya que en éste se asegura el

porcentaje de recobro más alto (entre 79.45 % y 80.83 %) 79.91 % con una desviación estándar y un coeficiente de variación (C. V.) entre los menores, concordando con el usado por Hutchings (65) (ver Tablas 11 y 12, y Figura 4).

En la determinación de la influencia de los grados de inclinación de la muestra en ensayo, en la reextracción con HCl 0.1 N por agitación mecánica, se encontró que existen diferencias muy significativas entre las medias M_1 y M_2 correspondientes a los blancos 1 y 2 en la determinación con 45° de inclinación. Las medias M_3 y M_4 correspondientes a los blancos 1 y 2 respectivamente en la determinación con 20° de inclinación resultan ser estadísticamente iguales con un nivel de significancia de 95 %. Lo anterior indica de manera indirecta una diferencia muy significativa en los blancos obtenidos con 45° .

Mediante la comparación entre las medias para 45° y 20° (M_1 , M_2 , M_3 y M_4) se observan diferencias significativas entre M_1 - M_3 y muy significativas entre M_2 - M_3 y M_2 - M_4 . Las medias M_1 - M_3 resultan estadísticamente iguales con un nivel de significancia del 99 %, así como M_1 - M_4 . De lo anterior se deduce que los grados de inclinación de la muestra en ensayo influyen en la determinación a causa de las variaciones en los blancos. También se deduce que la mejor inclinación para el ensayo de las muestras es a 20° dado que en ésta no se observan diferencias entre las medias y por lo tanto tampoco entre los blancos. Con la disminución de la posible interferencia del efecto del blanco en el método y la variación entre los resultados de ensayos no simultáneos (ver Tablas 13, 14 y 15).

Con el propósito de disminuir la cantidad de reactivos utilizados en el ensayo, principalmente de sulfato de amonio, se estudió la influencia del volumen de la mezcla de solventes y los gramos de sulfato de amonio mediante el diseño de cuatro diferentes tratamientos. Se encontró que todos los tratamientos son adecuados para los fines del estudio mediante el análisis de los parámetros estadísticos obtenidos (desviación estándar adecuada, coeficiente de variación menor del 5 % y porcentaje de recobro mayor a 70 %), se eligió el tratamiento C (1.5 g de sulfato de amonio y 10 ml de la mezcla de solventes) para el ensayo ya que se disminuye la cantidad de sulfato de amonio a la mitad y el volumen de la mezcla de solventes utilizado facilita el manejo de la muestra, aunque también es factible de elección el tratamiento A (ver Tablas 16 y 17).

Con el ensayo preliminar del método modificado para la cuantificación de isoniácida en saliva adicionada (Diagrama

3) se comprueba que el método es funcional y repetible en el intervalo de concentraciones de interés (0.6 a 14.4 mcg/ml) con un coeficiente de regresión y de determinación mayor a 0.99 en los dos días ensayados (ver Tabla 18 y Figura 5).

Linealidad del sistema: La relación absorbancia a 510 nm contra concentración en mcg/ml tiene un coeficiente de regresión mayor a 0.99 para los dos días de ensayo (día 1 y 2) y un coeficiente de determinación también mayor a 0.99. En los dos días de ensayo la ordenada al origen estadísticamente es de cero y las pendientes de acuerdo a la prueba realizada son estadísticamente iguales con un nivel de significancia del 95 %. La unión de los datos, día 1 y 2 (ver Tablas 19, 21 y 22), es posible por lo anterior, obteniéndose una relación lineal del tipo $y = mx + b$ en el intervalo de concentraciones de 0.8 a 10.0 mcg/ml, con un coeficiente de regresión de 0.996247 y un coeficiente de determinación de 0.992508, con una pendiente $m = 0.149698$, una ordenada al origen $b = 0.053196$ y un coeficiente de variación global de 1.25 %. El modelo lineal representa por lo tanto de manera correcta la concentración contra la respuesta medida (Tabla 21 y Figura 6). En la Tabla 20 se muestran los intervalos de confianza para los valores de cada concentración al 95 % de confianza, con una distribución normal. Estadísticamente la ordenada al origen b es igual a cero. De acuerdo a las Tablas 23 y 24 el sistema es preciso y repetible con un coeficiente de variación menor a 2 % (1.84 %).

Linealidad del método: Para la evaluación de la linealidad del método se trabajó en un intervalo de concentraciones adicionales que comprende la concentración considerada como el 100 % (6 mcg/ml) un límite superior al 150 % de esta concentración y uno inferior al 50 % de la misma (ver Tabla 25). La relación absorbancia contra concentración posee un coeficiente de regresión y de determinación mayor a 0.99 para los dos días ensayados (día 3 y 4). La pendiente del día 3 es estadísticamente igual a la pendiente obtenida en el día 4, y la ordenada al origen para cada curva es estadísticamente cero. Esto nos muestra que el método es lineal y repetible en el intervalo de concentraciones de 2 a 10 mcg/ml con una relación del tipo $y = mx + b$ (ver Tabla 27 y Figura 7). La unión de los datos de los dos días tiene un coeficiente de regresión de 0.999718 y un coeficiente de determinación de 0.999437, con una pendiente $m = 0.122279$, una ordenada al origen $b = -0.005365$ y un coeficiente de variación global de 1.77 %. Estadísticamente la ordenada al origen es cero (ver Tabla 28). La Tabla 26 muestra el intervalo de confianza al 95 % para los valores de cada concentración, con una distribución normal.

La relación concentración recuperada contra concentración añadida sigue una relación del tipo lineal $y = mx + b$, con un coeficiente de regresión de 0.998691 y un coeficiente de determinación de 0.997384, con una pendiente $m = 0.791788$, una ordenada al origen $b = -0.208025$ y un coeficiente de variación global de 2.14 %. Estadísticamente b es igual a cero (ver Tablas 29 y 31). En la Tabla 30 se observa el intervalo de confianza al 95 % para los valores de cada concentración, con una distribución normal.

Esto demuestra que el método analítico modificado es adecuado para la cuantificación de microcantidades de isoniacida en muestras de saliva, mostrando ventaja con respecto a otros métodos reportados en los cuales se debe controlar algunos parámetros de manera estricta como son: Temperatura, tiempo de formación del complejo cuya estabilidad máxima es de 90 minutos (66) además de tomar en cuenta que sólo son aplicables en formas farmacéuticas. Otra ventaja atribuible al método propuesto es la velocidad de formación del complejo (20 minutos) y su estabilidad que es por lo menos de 16 horas.

Exactitud y precisión: Los datos analíticos obtenidos para la determinación de estos parámetros se muestran en las Tablas 33 y 34 en donde se observa que los resultados del coeficiente de variación del método propuesto son menores del 3 %, lo cual indica reproducibilidad intra e inter día; el método es además repetible y exacto con respecto a la concentración y a el día-concentración con respecto a el análisis de varianza. De acuerdo a la prueba de hipótesis $H_0: M = 100$ % el método no es exacto ya que hay diferencias significativas, sin embargo, a un nivel de significancia del 99 % el método sí es exacto. Además, para fines prácticos se puede considerar exacto y repetible ya que los porcentajes de recuperación son cercanos al 100 % y la variación entre cada determinación es pequeña con un coeficiente de variación menor del 3 %, a pesar de ser un método espectrofotométrico aplicado a un fluido biológico.

El C. V. obtenido concuerda con los reportados por otros autores en los que se emplea cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), como es el caso de Hutchings (15, 66) que obtuvo un C. V. del 3.7 % en orina, de 1.3 % en plasma y 1.1 % en saliva; y Lauterburg (70) con un 4 % en plasma por cromatografía de gases-espectrometría de masa.

Para determinar la reproducibilidad entre individuos se realizó un estudio con tres voluntarios sanos, los datos analíticos se muestran en las Tablas 36 y 37, el respectivo análisis de varianza demuestra diferencias muy

significativas entre estos. Sin embargo al comparar las medias obtenidas para cada individuo se observaron diferencias muy significativas sólo entre el individuo A y C, siendo la media del individuo A estadísticamente igual a la del B con un nivel de significancia del 99 %, y la media del B estadísticamente igual a la del C con un nivel de significancia del 95 %. Esto debe tomarse en cuenta en la realización de estudios farmacocinéticos donde se adopte este método analítico, recomendando para la eliminación de este problema correr blancos a diferentes tiempos un día antes del estudio farmacocinético para cada individuo. Esta diferencia se atribuye a la constitución de la saliva la cual varía con respecto a la hora del día, a la edad y a la técnica utilizada en la toma de muestra (33). Sin embargo, la diferencia encontrada mediante parámetros estadísticos no resulta significativa para fines prácticos ya que la diferencia en el porcentaje de recobro del individuo A con respecto a el B y el C es de 5 a 7 % solamente.

Con el método modificado en este estudio se obtuvo un porcentaje de extracción de 79.18 %, este dato es consistente con el obtenido en un estudio anterior al presente para la extracción de isoniacida en muestras de orina utilizando el mismo método cuantitativo (62) donde se obtuvo un 79.59 % y con el encontrado por otros autores, del 77 % en orina, 68 % en sangre y 71 % en plasma, empleando CLAR (15, 65). Esto implica que este principio activo se comporta de manera semejante en las diferentes matrices biológicas, aun empleando para su separación y cuantificación diferentes métodos de análisis.

El límite de cuantificación y de detección fueron de 1.376 mcg/ml y 0.198 mcg/ml, respectivamente (ver Tablas 38 y 39).

12. CONCLUSIONES

- El procedimiento de limpieza de la muestra determinado como el apropiado para la cuantificación de isoniácida en muestras de saliva adicionada es el de extracción con solventes.
- En la etapa de desarrollo y estandarización las condiciones del método adaptado encontradas como óptimas son: Extracción de isoniácida a pH de 7.5 con 10 ml de la mezcla de solventes butanol:cloroformo 60:40 y 1.5 gramos de sulfato de amonio como agente salino, reextracción de isoniácida de la mezcla anterior con HCl 0.1 N por agitación mecánica durante 30 minutos a una inclinación de la muestra de 20°, y 400 mcl de agente complejante para la formación del cromóforo, en agua desionizada.
- El sistema establecido en el presente trabajo es lineal dentro del intervalo de concentraciones de 0.8 a 10.0 mcg/l, cumpliendo satisfactoriamente con los parámetros estadísticos de precisión y repetibilidad.
- El método espectrofotométrico propuesto para la determinación de isoniácida en muestras de saliva adicionada cumple satisfactoriamente con los parámetros evaluados de linealidad, exactitud, repetibilidad y precisión. Es reproducible entre concentraciones y días de acuerdo a los criterios de validación adoptados (por una prueba de análisis de varianza). La variación encontrada entre individuos no es significativa desde un punto de vista práctico. Posee un porcentaje de extracción comparable con los obtenidos por otros métodos más sofisticados como son CLAR y CG-EM, y un límite de detección y cuantificación bastante aceptables tomando en cuenta su naturaleza.
- Este método tiene un procedimiento largo pero sencillo, exacto y confiable estadísticamente hablando para los fines del estudio cuyo objetivo principal es el de aportar un método aplicable a la terapia antituberculosa cuantificando a isoniácida en muestras de saliva de manera sencilla, rápida y económica, utilizando el espectrofotómetro como equipo básico. Es además perfectamente adaptable en la determinación de la farmacocinética de isoniácida en individuos sanos y pacientes, dado que la relación reportada en la bibliografía entre la concentración sanguínea de este fármaco y la salival es casi de 1 (15).

APÉNDICE I

MÉTODO DE PRODROMOS (29)

Determinación de isoniácida en agua:

Volumenes de solución estándar de isoniácida correspondientes a 2.7 - 54 mcg de isoniácida se transfieren cuantitativamente en un matraz volumétrico de 5 ml, y se diluye a el volumen con agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2 previamente ajustada con HCl ó NaOH 1 N. Posteriormente se le adiciona 400 mcI (0.4 ml) de agente complejante (A. C.) ó mezcla de reactivos, se agita y se coloca durante 20 a 25 minutos en un baño de agua a 50 ° +/- 0.5 °C. Finalmente la solución se deja enfriar hasta la temperatura ambiente en un baño de agua.

La absorbancia de la solución rojo- naranja es leída a una longitud de onda de 510 nm, utilizando una solución blanco preparada bajo las mismas condiciones.

APÉNDICE II

SISTEMAS BASE , PRIMARIOS Y CURVAS DE CALIBRACIÓN DE INH/AGUA E INH/SALIVA.

1. Sistema Base de INH/Agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2.

Todas las soluciones siguientes se preparan en agua desionizada a pH 5.0 +/- 0.2.

A partir de la solución de INH STD preparar soluciones de cinco concentraciones de INH/Agua desionizada de acuerdo con la tabla 1.

TABLA 40. Sistemas base INH/agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2.

SISTEMA	CONCENTRACIÓN	ml INH STD	VOLUMEN
NÚMERO.	mcg/ml		FINAL ml
1	36.0	1	10
2	72.0	2	"
3	108.0	3	"
4	144.0	4	"
5	180.0	5	"

Procedimiento: Colocar en matraces volumétricos de 10 ml el volumen de INH STD correspondiente con pipeta volumétrica, llevar al volumen con agua desionizada tapar y agitar perfectamente en vortex durante 10 segundos y manualmente.

2. Curva de Calibración de INH/Agua desionizada.

2.1. Sistema Primario de INH/Agua desionizada.

Este sistema esta constituido por ocho concentraciones preparadas por dilución del Sistema base de INH/agua desionizada.

TABLA 41. Sistema primario INH/agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2.

CONCENTRACIÓN	CONCENT. SISTEMA BASE	SISTEMA BASE	SISTEMA BASE	VOLUMEN
	mcg/ml	VOLUMEN ml		FINAL ml
A	1.44	1	1	25
B	2.88	1	2	25
C	3.60	1	1	10
D	5.76	1	4	25
E	7.20	1	2	10
F	10.80	1	3	10
G	14.40	1	4	10
H	18.00	1	5	10

CONCENT. = CONCENTRACIÓN.

Procedimiento: Colocar en matraces volumétricos de la capacidad requerida el volumen con pipeta volumétrica de cada una de las concentraciones correspondientes del Sistema base de INH/agua desionizada, llevar al volumen con agua desionizada, tapar y agitar en vortex durante 10 segundos y manualmente.

2.2. Curva de calibración INH/agua desionizada.

Esta curva esta constituida por ocho concentraciones y se prepara a partir del Sistema primario de INH/agua desionizada.

TABLA 42. Curva de calibración INH/agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2.

CONC.	CONC.	SIST. PRIM.	SIST. PRIM.	VOLUMEN	A.C.
	mcg/ml	VOLUMEN ml		FINAL ml	ml
I	0.8	3	A	5	0.4
J	1.6	"	B	"	"
K	2.0	"	C	"	"

TABLA 42. Continuación.

L	3.2	"	D	"	"
M	4.0	"	E	"	"
N	6.0	"	F	"	"
O	8.0	"	G	"	"
P	10.0	"	H	"	"

CONC. = CONCENTRACIÓN.

SIST. PRIM. = SISTEMA PRIMARIO.

A.C. = AGENTE COMPLEJANTE, Mezcla de reactivos.

Procedimiento: De cada una de las concentraciones del Sistema primario de INH/agua desionizada tomar 3 ml con pipeta volumétrica y colocar en matraces volumétricos de 5 ml, llevando al volumen con agua desionizada. Agregar con micropipeta de 400 mcl el mismo volumen de agente complejante, A.C., tapar y agitar perfectamente de forma manual trasvasar a tubos de ensaye secos y desarrollar reacción de color, leer absorbancia a una longitud de onda de 510 nm.

3. Placebos Añadidos de INH/SALIVA.

Todas las soluciones siguientes se preparan con saliva ajustada a pH 7.5, y con agua desionizada pH 5.0 +/- 0.2.

3.1. Curva de Calibración Primaria de Placebos Añadidos de INH/SALIVA.

Este sistema contiene cinco concentraciones, las cuales se preparan a partir del Sistema base de INH/agua desionizada.

TABLA 43. Curva de calibración primaria de placebos añadidos de INH/saliva.

CONC.	CONC.	SIST.BASE	SIST.BASE	VOLUMEN
	mcg/ml	VOLUMEN ml	CONC. NUM.	FINAL ml
A	3.6	1	1	10
B	7.2	1	2	"

TABLA 43. Continuación.

C	10.8	1	3	"
D	14.4	1	4	"
E	18.0	1	5	"

CONC. = CONCENTRACIÓN.

SIST. BASE = SISTEMA BASE.

NÚM. = NÚMERO.

Procedimiento: En matraces volumétricos de 10 ml colocar con pipeta volumétrica 1 ml de cada una de las concentraciones enumeradas del Sistema base de INH/agua desionizada, agregar con pipeta graduada 1 ml de saliva y agitar con el matraz tapado 15 segundos en Vortex a la velocidad número 3. Agregar volúmenes de 2 ml de saliva con 30 segundos de agitación en Vortex a la misma velocidad en cada adición, hasta poco antes de la marca de aforo. Adicionar una pequeña gota de etanol para romper la espuma formada en la agitación y llevar al volumen con saliva; agitar finalmente por 60 minutos en Vortex y trasvasar a vasos de precipitado de 50 ml debidamente etiquetados y tapados con papel aluminio. Para su conservación congelar a - 20 °C. Es muy importante en cada adición de saliva asegurar la homogenización de la misma por agitación.

3.2. Curva de Calibración de Placebos Añadidos de INH/SALIVA.

Esta curva de calibración de INH/SALIVA final tiene cinco concentraciones preparadas de la Curva de calibración primaria de placebos añadidos de INH/saliva.

TABLA 44. Curva de calibración de placebos añadidos de INH/saliva.

CONC.	CONC.	CURVA CAL.	PRIM. CONC.	VOLUMEN	A.C.
NÚM.	mcg/ml	VOLUMEN ml		FINAL ml	ml
1	2	3	A	5	0.4
2	4	3	B	"	"
3	6	3	C	"	"
4	8	3	D	"	"

TABLA 44. Continuación.

5	10	3	E	"	"
---	----	---	---	---	---

CONC. = CONCENTRACIÓN.

NÚM. = NÚMERO,

CURVA CAL. PRIM. = CURVA DE CALIBRACIÓN PRIMARIA DE IHH/SALIVA.

A.C. = AGENTE COMPLEJANTE. Mezcla de reactivos.

Procedimiento:

DETERMINACIÓN DE ISONIACIDA EN SALIVA MEDIANTE UNA ADAPTACIÓN DEL MÉTODO DE PRODROMOS.

- a) En tubos de ensaye depositar 3 ml con pipeta volumétrica de IHH/SALIVA.
- b) Agregar 10 ml de mezcla de solventes Butanol:Cloroformo 60:40; tapar perfectamente con tapones de neofreno forrados con papel aluminio y agitar en Vortex por 2 minutos a la velocidad número 7.
- c) Agregar 1.5 g de Sulfato de Amonio y tapar, agitar nuevamente en Vortex 2 minutos a la misma velocidad.
- d) Centrifugar a 2000 rpm durante 17 minutos.
- e) Separar la capa orgánica con pipeta pasteur y depositar en tubos de ensayo secos; separando la mayor parte posible sin arrastrar partículas de la pastilla de proteínas.
- f) Tomar con pipetas volumétricas de 5 y 4 ml, 9 ml de la fase orgánica y transferir a tubos con tapón rosca de 50 ml los cuales deben contener 4 ml de HCl 0.1 N tomados con pipeta volumétrica.
- g) Agitar en Vortex durante 10 segundos tapando y destapando para liberar la presión a la velocidad número 5.
- h) Agitar mecánicamente en ROTO TORQUER durante 30 minutos con una inclinación de 30°.
- i) Dejar reposar los tubos durante 10 minutos y separar la fase ácida en vasos de precipitado de 50 ml con pipeta pasteur.
- j) Ajustar el pH a 5.0 +/- 0.2 a la fase ácida así obtenida con NaOH 0.1, 0.5, 4.0 N ó HCl 0.1, 1.0 N.

k) Trasvasar a un matraz volumétrico de 5 ml y llevar al volúmen con agua desionizada pH 5.0.

l) Agregar con micropipeta 0.4 ml del agente complejante, agitar perfectamente de manera manual y trasvasar a tubos de ensayo secos.

m) Desarrollar reacción de color y leer absorbancia a 510 nm.

APÉNDICE III

FÓRMULAS ESTADÍSTICAS Y CRITERIOS UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO (62, 71, 72).

LINEALIDAD

1.- Calcular Σx , Σx^2 , Σy , Σy^2 , Σxy .

2.- Calcular la pendiente m

$$m = \frac{n\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

donde n es el número de muestras.

3.- Calcular la ordenada al origen

$$b = \frac{\Sigma y - m\Sigma x}{n}$$

4.- Calcular el error estándar de regresión

$$S_{x/y} = \frac{\Sigma x^2 - m\Sigma xy - b\Sigma y}{n}$$

5.- Calcular el coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y)^2}{<(n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2)(n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2)>}$$

6.- Calcular el coeficiente de regresión

$$r = (r^2)^{1/2}$$

7.- Calcular los límites de confianza (95 %) para la pendiente m

7.1. calcular el error estándar para la pendiente (SM)

$$SM = (S_{y/x}) \left\langle \frac{1}{(\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2/n)} \right\rangle^{1/2}$$

7.2. determinar en la tabla de distribución de "t" de student el valor $t_{(n-2, 0.975)}$

7.3. calcular el intervalo de confianza para la pendiente m con la ecuación

$$ICM = M \pm t_{(n-2, 0.975)} (SM) .$$

8.- Calcular los límites de confianza (95 %) para la ordenada al origen b

8.1. calcular el error estándar para la ordenada al origen
SB

$$SB = S_y/x < 1/n + \frac{x^2}{\frac{(\sum x)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} >^{1/2}$$

8.2. determinar en la tabla de distribución de "t" de student el valor para $t_{(n-2, 0.975)}$

8.3. calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen (ICB)

$$ICB = B \pm t_{(n-2, 0.975)} (SB) .$$

9.- Calcular el intercepto relativo

$$IR = b/\bar{y} .$$

10.-Calcular el error estándar relativo

$$ESR = \frac{S_y}{x} \cdot \frac{1}{y}$$

11.-Coeficiente de variación por el nivel de concentración

$$c. v. = \frac{DE \times 100}{x}$$

donde DE = Desviación estándar

$$DE = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} >^{1/2}$$

12.-Intervalo de confianza (95 %) para el nivel de concentración

$$IC = x \pm Z (DE) .$$

13.-Pendiente relativa (PR)

$$PR = \frac{Mo\bar{X}}{\bar{y}}$$

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

1.- Hacer una prueba de pendientes

$$H_0: m_1 = m_2$$

$$H_1: m_1 \text{ diferente a } m_2$$

calcular la "t" experimental o "t" calculada

$$t = \frac{m_1 - m_2}{S_{y/x1} + \left(\frac{1}{S_{sx1}} + \frac{2}{S_{sx2}} \right)^{1/2}}$$

relación crítica bilateral con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ para la pendiente

$$t_{0.025} < t_{\text{cal}} < t_{0.975}$$

comparar el valor de t calculada con el de t de tablas.

Si $t_{\text{cal}} < t_{\text{tablas}}$ la hipótesis de nulidad no se rechaza.

2.- Hacer prueba de hipótesis para la ordenada al origen

$$H_0: b = 0$$

$$H_1: b \text{ diferente a } 0$$

calcular la t experimental

$$t = \frac{b-0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n \sum (\sum x_i - \bar{x})^2}}}$$

relación crítica bilateral con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ para la ordenada al origen

$$t_{0.025} < t_{\text{cal}} < t_{0.975}$$

comparar el valor de t calculada con el de t de tablas.

Si $t_{\text{cal}} < t_{\text{tablas}}$ la hipótesis de nulidad no se rechaza.

$$4.- r^2 > 0.98$$

$$5.- r > 0.99$$

$$6.- IR < 10.2$$

- 7.- ESR < 0.30
 8.- CUR/C < 3.0 %
 9.- PR = 0.98 - 1.02

EXACTITUD

- 1.- Calcular la media

$$\bar{x} = \frac{\sum x_1}{n}$$

donde x_1 es cada una de las respuestas obtenidas y n es el número de muestras analizadas.

- 2.- Calcular la desviación estándar

$$DE = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad 1/2$$

3. Calcular el coeficiente de variación.

- 4.- Calcular el intervalo de confianza (95 %) para la media

$$IC = \bar{x} \pm t_{0.95} \frac{DE}{n}$$

donde $t_{0.95}$ es el valor que se busca en las tablas de "t" de student para $n-1$ grados de libertad y $\alpha = 0.05$.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

- 1.- Hacer prueba de hipótesis para la media

H_0 : $\bar{x} = 100$ % adicionado

H_1 : \bar{x} diferente a 100 % adicionado

con un nivel de significancia (α) = 0.05

calcular la "t" experimental

$$t_{exp} = \frac{x - 100}{\bar{x}}$$

donde $\bar{x} = DE/(n)^{1/2}$

buscar el valor de t teórica en las tablas de "t" de student para $n-1$ grados de libertad y $\alpha = 0.05$ (mismo valor que para el IC).

Comparar el valor de t experimental con el t de tablas.
Si $t_{0.025} < t_{cal} < t_{0.975}$ no se rechaza H_0 y el método puede ser considerado exacto con un 95 % de confianza.

2.- El valor del coeficiente de variación debe estar de acuerdo al método.

EXACTITUD Y PRECISIÓN (REPETIBILIDAD)

Se llevó a cabo en base a un análisis de varianza utilizando 3 concentraciones diferentes, cada una por sextuplicado en tres días diferentes.

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada
Conc.	a-1	$\sum y_i^2 \dots - y^2 \dots$	S. C. c	C. M. c
		-----	-----	-----
	br	abr	G. L. c	C. M. e
Día	b-1	$\sum y^2 \cdot j - y^2 \dots$	S. C. d	C. M. d
		-----	-----	-----
	ar	abr	G. L. d	C. M. e
Día-Conc.	(a-1)(b-1)	$\sum y^2 ij - \sum y^2 i \dots$	S. C. d-c	C. M. d-c
		-----	-----	-----
	r	br	G. L. d-c	C. M. e
		$\sum y^2 \cdot j - \sum y^2 \dots$		
		-----	-----	-----
	ar	abr		
Error	(r-1)ab	$\sum y^2 ijk - \sum y^2 ij \dots$	S. C. e	
		-----	-----	
		r	G. L. e	

En donde:

- a = Número de concentraciones.
- b = Número de días.
- r = Número de repeticiones.

C. M.c, C. M.d, C. M.d-c, C. M.e = Cuadrado medio de la concentración, del día, del día-concentración y error respectivamente.

S. C.c, S. C.d, S. C.d-c, S. C.e = Suma de cuadrados de la concentración, del día, del día-concentración y error respectivamente.

G. L.c, G. L.d, G. L.d-c, G. L.e = Grados de libertad de la concentración, del día, del día-concentración y error respectivamente.

Criterios:

1) H_0 : No se modifica el porcentaje de recuperación con respecto a la concentración.

2) H_0 : No se modifica el porcentaje de recuperación con respecto a el día.

3) H_0 : No se modifica el porcentaje de recuperación con respecto a el día-concentración.

Si F calculada es $< F_{0.95}$ la hipótesis de nulidad no se rechaza.

REPRODUCIBILIDAD ENTRE INDIVIDUOS

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA				
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada
Individuo	$d-1$	$\sum y^2_{i.} - y^2_{..}$	S. C.i	C. M.i
	----	----	-----	-----
		r rd	G. L.i	C. M.e
Error	$(r-1)d$	$\sum y^2_{ij} - \sum y^2_{i.}$	S. C.e	

			r	G. L.e
Total	$(dr-1)$	$\sum y^2_{ij} - \sum y^2_{..}$	S. C.t	

			dr	G. L.t

En donde:

d = Número de individuos.
r = Número de replicaciones.

C. M.i = Cuadrado medio del individuo.

S. M.i, S. M.e, S. M.t = Suma de cuadrados del individuo, del error y total respectivamente.

G.. L.i, G. L.e, G. L.t = Grados de libertad del individuo, del error y total respectivamente.

Criterio:

1) H_0 : No se modifica el porcentaje de recuperación con respecto a el individuo.

Si F calculada es $< F_{0,95}$ la hipótesis de nulidad no se rechaza.

PRUEBA DE MEDIAS

$H_0: \mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1$ diferente a μ_2

calcular t experimental

$$t \text{ cal} = \frac{(\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{S_p^2}{n_1} + \frac{S_p^2}{n_2}}} \cdot \frac{1}{2}$$

$$\text{donde } S_p = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Si t calculada cae dentro del intervalo de $t_{0,025} < t \text{ cal} < t_{0,975}$ la hipótesis de nulidad no se rechaza.

LIMITE DE DETECCION (LD) Y DE CUANTIFICACION (LC)

$$LD = \frac{LSICb - b}{m}$$

donde LSICb = Límite superior del intervalo de confianza para la ordenada al origen.

$$LSICb = mLC + b + \frac{1}{2} t_{0,95} S_{y/x} \left(\frac{1}{n} + \frac{(LC - x)^2}{S_{xx}} \right)$$

$$\text{donde } S_{xx} = (n-1)S^2x$$

13. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Litter, "Compendio de Farmacología", 3^{era} edición, El Ateneo, Argentina 1984, pág. 571-75.
- 2.- Hernán San Martín, "Salud y Enfermedad", 4^a edición, Ediciones Científicas La Prensa Médica Mexicana, S.A., México 1981, pág. 114, 264-66, 270.
- 3.- Clarke s A.C. Moffat, "Isolation and Identification of Drugs", The Pharmac. Press, London Great Britain 1969, pág. 688-89.
- 4.- U.S. Pharmacopeial National Formulary, USP XXI NF XVI. United States Pharmacopeial Convention, In. 1985, pág. 556-57.
- 5.- U.S. Pharmacopeial National Formulary, USP XXII NF XVI, United States Pharmacopeial Convention, Inc. 1990, pág. 728-30.
- 6.- The Merk Index, 10^a edición, Merk and Co. Inc., USA, México 1983, pág. 745-46.
- 7.- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry, Sidney Williams, USA 1984, pág. 287, 716.
- 8.- Klaus, Florev, y ad., "Analitical profiles of drugs substances". U. S. A., 1977, pág. 183-258.
- 9.- Goodman-Gilman, "Bases farmacológicas de la terapéutica" 5^a edición, Ed. Médica Panamericana, México 1982, pág. 1177-79.
- 10.- Hans R. Held and Landi S., "Binding of toxic metabolites of isoniazid by aconiazide", J. Pharm. Sci., (1990), 420-24.

- 11.-Francisca L. de Dauxón, "Sistema Respiratorio", Universidad Nacional Autónoma de México, ENEP-Ixtacala, México 1984, pág. 466-67.
- 12.-Remington's, "Pharmaceutical Sciences", 17^a edición, Editorial Médica Panamericana, S. A., Argentina 1987, pág. 1648-49.
- 13.-G. A. Ellard, "The determination of isoniazid and its metabolites acetylisoniazid, monoacetylhydrazine, diacetylhydrazine, isonicotinic acid and isonicotinil-glycine in serum and urine", Biochem. J. (1972) 126, 449-58.
- 14.-Hettie B. Hughes, "On the metabolic fate of isoniazid", The J. of Pharm. and Exp. Ther. (1983) 109, 444-52.
- 15.-A. D. Hutchigs y ad., "Saliva and plasma concentration of isoniazid in man", Clin. Pharmac. (1988) 25, 585-89.
- 16.-Brewer, A. G., "Isoniazid in florev. Analytical of drugs substances", Ed. Academic, N. Y. 1974, pág. 183-257.
- 17.-Rostein, "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas", 32^a edición, Grupo Editorial Mexicano, S.A. de C.V., México 1986, pág. 287, 585, 635, 743.
- 18.-M. B. Devani y ad., "Differential nonaqueous titration of isoniazid and sodium p.aminosalicylate mixtures", J. of. Pharmac. Sc. (1970) 59, 90-3.
- 19.-J. H. Peters, "Studies on the metabolic basis for the genetically determined capacities for isoniazid inactivation in man", The J. of Pharm. and Exp. Ther. (1979) 150, 298-304.
- 20.-Allen S. Yard, "Aspects of the metabolism of isoniazide and acetylisoniazide in the man and dog", A. S. Yard and McKennis (1962) 5, 196-203.
- 21.-Leonard C. Bailey, "High-Performance Liquid Chromatography analysis of isoniazid and its dosage forms", J. of. Pharmac. Sc. (1977) 4, 564-68.

- 22.-Edward M. Scott, "Fluorometric determination of isoniazid in serum", J. Lab. and Clin. Med. (1967) 70, 335-60.
- 23.-Harold G. Borebaum y ad., "Plasma an salivary concentration of isoniazid in man: preliminary findings in two acetylatos subjets", J. of. Pharmac. and Biopharm. (1975) 6, 448-55.
- 24.-M. B. Debani y ad., "Spectrophotometric determination of isoniazid in presence of its hydrazones", (1978) 67, 661-63.
- 25.-S. Sved y ad., "Bioavailability of three isoniazid formulations", J. of Pharmac. Sc. (1970) 66, 1761-64.
- 26.-Wen-Hug Wu y ad., "Interaction of isoniazid with magnesium oxide and lactose", J. of Pharmac. Sc. (1970) 59, 1234-42.
- 27.-Georg Karlaganis, "Analysis of isoniazid, acetylhydrazine and /15 n2/ acetylhydrazine in serum by capillary gas chromatograpy-amonia chemical ionization mass spectrometry", J. of Chromato. (1987) 420, 171-77.
- 28.-D. Pankow, "Dichlorometane metabolism to carbon monoxide can be induced by isoniazid, acetona and fasting", Arch. Toxicol. Suppl. (1989) 13, 302-03.
- 29.-Prodromos B. Issopoulos y ad., "A sensitive colorimetric determination of microquantities of isonicotinic acid hydrazide (isoniazid)". Intern. J. of Pharmac. (1989) 57, 235-39.
- 30.-Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, Vol. 107, No. 4, Octubre 1989, pág. 278-88.
- 31.-Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, Vol. 110, No. 3, Marzo 1991, pág. 245-46.
- 32.-Van Der Kleijn, F. Baars, y ad., "Pharmacokinetics interpretation of the fate of drugs in body fluids". En: The serum concentration of drugs, Clinical relevance, theory and practice. Ed. F. W. H. M. Merkus,

Excerpta Medica, E. U. A. 1980, pág. 18-47.

- 33.-Seifert A. y ad., "Physiology and Biochemistry", in The disease of the salivary glands pathology-diagnosis-treatment-facial nerve surgery. Eds. Georg. Thieme Verlag, Thieme, Inc.; E. U. A. 1986, pág. 1-43.
- 34.-Anavekar, S. N. y ad., "Parotid and whole saliva in the prediction of serum total and free phenytoin concentrations". Clin. Pharmacol. Ther. (1978) 24. 629-37.
- 35.-Dawes C., "The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva", Arch. Oral Biol., (1969) 14, 277.
- 36.-S. Loft y ad., "Antipyrine clearance in children from single saliva samples", Br. J. Clin. Pharmac. (1985) 19, 698-700.
- 37.-H. Schroder y ad., "Lack correlation between methotrexate concentration in serum, saliva and sweat after 24h methotrexate infusions", Br. J. Clin. Pharmac. (1987) 24, 537-41.
- 38.-J. C. Mucklow y ad., "Drug concentration in saliva", Clin. Pharmacol. Ther. (1973) 24, 563-69.
- 39.-G. John DiGregorio y ad., "Diazepam concentration in parotid saliva, and plasma", Clin. Pharmacol. Ther. (1978) 24, 720-25.
- 40.-Marjorie G. Horring y ad., "Use of saliva in therapeutic drug monitoring", Clin. Chem. (1977) 23, 157-64.
- 41.-M. Van Der Graaff y ad., "Pharmacokinetics of orally administered hexobarbital in plasma and saliva on healthy subjects", Biopharm. and Drug Disp. (1986) 7, 265-72.
- 42.-J. W. Paxton y ad., "Phenytoina concentration in mixed, parotid and submandibular saliva and serum measured by

- radioimmunoassay", Br. J. Clin. Pharmacol. (1977) 4, 185-91.
- 43.-Garry Graham y ad., "Application of salivary salicylate data to biopharmaceutical studies of salicylates", J. of Pharmacol. Sc. (1972) 61, 1219-22.
- 44.-J. W. Paxton y ad., "Use of whole saliva for bioavailability studies with reference to phenytoin", J. Pharm. Pharmacol. (1980) 32, 586-88.
- 45.-K. W. Stephen, "Methods for collecting individual components of mixed saliva: the relevance to clinical pharmacology", Br. J. Clin. Pharm. (1976) 3, 315-19.
- 46.-Huffman, D. H., "Relationship between digoxin concentrations in serum and saliva". Clin. Pharmacol. Ther. (1975) 17. 310-12.
- 47.-Fraser, H. S. y ad., "Assessment of antipyrine kinetics by measurement in saliva". Br. J. Clin. Pharmacol. (1976) 3. 321-25.
- 48.-Shanker, L. S., "Passage of drugs across body membranes" Pharmacol. Reviews. (1962) 14. 501-30.
- 49.-Killmann, S. A. y ad., "The permeability of the human parotid gland to a series of sulfonamide compounds, paraaminohippurate and inulin". Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1975) 7. 86-91.
- 50.-Matin, S. B. y ad., "Pharmacokinetics of tolbutamide: prediction by concentration in saliva". Clin. Pharmacol. Ther. (1974) 16. 1052-58.
- 51.-Svensson, C. K., "Is blood sampling for determination of antipyrine pharmacokinetics in healthy volunteers ethically justified?". Clin. Pharmacol. Ther. (1988) 44. 365-68.
- 52.-J. J. MacKichan y ad., "Salivary concentration and plasma protein binding of carbamazepine and carbamazepine 10.11-epoxide in epileptic patients", Br. J. Clin. Pharmacol. (1981) 12, 31-7.

- 53.-Lowe, J. R. y Dixon, J. S., "Salivary kinetics of prednisolone in man". *J. Pharm. Pharmacol.* (1982) 35. 390-91.
- 58.-Vimlehs Seth y ad., "Comparison between serum isonicotinic acid hydrazine (INH) levels and urinary sulfadimide (sulfamethazine) acetylation as a predictors of isoniazid acetylation status", *Dev. Pharm. Ther.* (1988) 11, 32-6.
- 59.-Uinod P. Shah, Ph. D., "Analytica methods used in bioavailability studies a regulatory viewpoint". *Clin. Res. Practices and Drug Reg. Affairs* (1987) 5. 51-60.
- 60.-Guideline of general principles of process validation. (1987), elaborado por: Center for drugs and biologics and center for devices and radiological health food and drugs administration, U. S. A., págs. 3,56-70.
- 61.-Bernard Loftus, "Pharmaceutical process validation". Ed. Marcel and Dekker Inc., U. S. A., 23. págs. 203-85.
- 62.-"Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de isoniazida en orina por un método espectrofotométrico". Martín Aguilar V. y Velia Torres A., U. N. A. M., Cuautitlan Izcalli, Edo. Méx. 1992. TESIS.
- 63.-James Blanchard, "Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis". *J. of Chromatography*, (1981) 226, 455-60.
- 64.-DuMont F. Elmendorf, "The absorption, excretion, and short-term toxicity of isonicotinic acid hydrazide (nydrazid¹) in man". *The pharmaceutical press*, (1952) 1, 429-42.
- 65.-A. Huchings, "High-performance liquid chromatographic analysis of isoniazid and acetylisoniazid in biological fluids". *J. of Chromatography*, (1983) 277, 385-90.
- 66.-W. Von Sassen y ad., "Determination of isoniazid, acetylisoniazid, acetylhydrazide and diacetylhydrazine in biological fluids by high-performance liquid

- chromatography". *J. of Chromatography*, (1985) 338, 113-122.
- 67.-T. Inaba y ad., "On phenotyping with isoniazid: the use of urinary acetylation ratio and the uniqueness of antinodes study of two Amerindian populations", *Clin. Pharm. Ther.* (1987) 42, 493-97.
- 68.-M. D. Littey, "The effect of the thyrotoxicosis on isoniazid acetylation", *Br. J. Clin. Pharmac.* (1988) 26, 103/06.
- 69.-"Cuantificación de los niveles plasmáticos de isoniácida en sujetos sanos voluntarios", *Refugio Romero C., U. N. A. M., ENEP-Zaragoza, Edo. Méx. D.F., 1989, pág. 41-2.*
- 70.-Lauterburg B. H. y ad., "Determination of isoniazid and its hydrazino metabolites acetylisoniazid, acetylhydrazine and diacetylhydrazine in human plasma by gas-chromatography-mass spectrometry". *J. of Chromatography*, (1981) 224, 431-38.
- 71.-Wayne W. Daniel, "Bioestadística", ed. Limusa, México 1979, págs. 453-4, 457, 461.
- 72.-"Validación del método analítico para la valoración de diclofenaco sódico en grageas de liberación prolongada y materia prima", Lucía Ramírez Grande, U. N. A. M., Cuautitlan Izcalli, Edo. Méx., 1992.
- 73.-Gyton, "Tratado de Fisiología Médica", 6a edición, Interamericana, México 1984, pág. 954-56.
- 74.-John A. Timbrel y ad., "Monoacetylhydrazine as a metabolite of isoniazid in man", *Clin. Pharm. Ther.* (1977) 22, 602-08.
- 75.-D. W. Russel, "Determination of isonicotinic acid hydrazide in urine", *Clin. Chim. Act.* (1971) 31, 367-73.
- 76.-A. D. Siefkin y ad., "Isoniazid overdose: pharmacokinetics and effects of oral charcoal in treatments", *Human. Toxicol.* (1987) 6, 497-501.

- 77.-H. Engelhardt, "Practice of high performance liquid chromatography, applications, equipment and quantitative analysis", Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, pág. 162.
- 78.-C. J. Bracon y ad., "A method for obtaining individual saliva samples from infants and young children", Br. J. Clin. Pharm. (1978) 5, 89-90.
- 79.-Gibaldi, M. y Perrier, D.. "Pharmacokinetics" en: Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Marcel Dekker, Inc. E. U. A., (1982), pág. 445.
- 80.-"Contribución al establecimiento de metodología analítica y protocolo experimental para estudios farmacocinéticos de metronidazol en pacientes pediátricos", Q. F. I. Beatriz Ramírez Mora, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Químicas, Tijuana, Baja California, México, 1992. TESIS.